

Titre: Lyophilisation et concentration de complexes chitosane/ADN et
Title: chitosane/ARNic pour la thérapie génique

Auteur: Daniel Veilleux
Author:

Date: 2016

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Veilleux, D. (2016). Lyophilisation et concentration de complexes chitosane/ADN
Citation: et chitosane/ARNic pour la thérapie génique [Thèse de doctorat, École
Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2263/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2263/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Michael D. Buschmann, & Marc Lavertu
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

LYOPHILISATION ET CONCENTRATION DE COMPLEXES CHITOSANE/ADN ET
CHITOSANE/ARN_{ic} POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE

DANIEL VEILLEUX

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

LYOPHILISATION ET CONCENTRATION DE COMPLEXES CHITOSANE/ADN ET
CHITOSANE/ARN^{ic} POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE

présentée par : VEILLEUX Daniel

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., président

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. LAVERTU Marc, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. LECLAIR Grégoire, Ph. D., membre

Mme TABRIZIAN Maryam, Ph. D., membre externe

REMERCIEMENTS

Je désire en premier lieu remercier mon directeur, le professeur Michael Buschmann, qui a accepté de superviser mes travaux de thèse, me permettant ainsi de bénéficier de ses connaissances, de ses conseils, et de ses nombreuses installations. Je tiens aussi à le remercier pour la confiance qu'il m'a accordée et les nombreuses opportunités qui ont découlé de mes travaux.

Je tiens ensuite à remercier mon codirecteur, le Dr Marc Lavertu, pour son soutien, sa disponibilité et sa compréhension tout au long de mon doctorat. J'ai beaucoup apprécié nos nombreuses discussions, même si elles impliquaient parfois un peu trop de physique à mon goût...

Je tiens aussi à remercier les professeurs Maryam Tabrizian, Grégoire Leclair, et Gregory De Crescenzo d'avoir accepté de se joindre à mon jury pour évaluer mes travaux.

Je remercie tous mes collègues des dernières années avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, discuter, et bien sûr rire. Un merci particulier à Rajesh, Vincent, Pei Lian, David, Jessica, Colleen, Karim, Nic, Yuan, Monica, et Anik, de même qu'à mes partenaires de conférences Mohamad et Ashkan.

Je veux aussi adresser un remerciement spécial à Julie, qui a dû faire des pieds et des mains tout au long de mon doctorat pour s'assurer que mes commandes spéciales soient reçues et que tout soit fonctionnel au laboratoire.

Je remercie également le FQRNT, le CRSNG, et la Fondation de Polytechnique pour les bourses qui m'ont été octroyées pendant la thèse, de même que le CC-CRS, pour la bourse m'ayant permis d'assister à leur conférence à Vancouver.

Un grand merci à Ariane, Marta, Aracelli (et cie), et ma gang d'ingénieurs (Jonathan, J-F et Érick), pour tous les moments de distraction, de plaisirs, et de détente qui ont ponctué ces dernières années. Maintenant, vous ne pourrez plus me demander : « *Quand est-ce que tu finis ton doc?* »

En terminant, je veux remercier ma famille pour leur soutien inconditionnel tout au long de ma thèse. Vous avez été une source constante de motivation, je n'y serais pas parvenu sans vous.

RÉSUMÉ

Beaucoup de ressources ont été investies au cours des dernières décennies pour développer des vecteurs de livraison de gènes polymériques sécuritaires et efficaces pour des applications cliniques. Le chitosane (CS), un polysaccharide cationique naturel, permet de condenser l'ADN ou l'ARN interférent court (ARNic) pour former des polyplexes dont l'efficacité de transfection élevée a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Afin d'être utilisée en clinique, ces formulations doivent toutefois atteindre des doses thérapeutiques; elles doivent être adaptées pour un usage intraveineux; et elles doivent être stabilisées pour le transport et l'entreposage. Les objectifs de la thèse étaient: d'identifier des formulations biocompatibles de complexes CS/ADN et CS/ARNic pouvant être lyophilisées et concentrées, tout en préservant leurs propriétés et en demeurant isotoniques; de développer des compositions lyophilisées de polyplexes hémocompatibles ayant un pH neutre; et d'optimiser les cycles de lyophilisation des formulations.

Une première étude, menée sur des polyplexes CS/ADN préparés à un ratio amine/phosphate (N/P) de 5, a permis de déterminer que l'ajout de 0.5% m/V de sucrose, dextran 5 kDa ou tréhalose, combiné à 3.5 mM histidine (pH 6.5), était nécessaire pour préserver le pH des formulations et éviter l'aggrégation des complexes pendant la lyophilisation. Ces compositions pouvaient ensuite être réhydratées à une concentration 20 fois plus élevée (~1 mg d'ADN/mL), tout en ayant un pH et une tonicité quasi physiologiques. Les formulations concentrées ont généré des polyplexes ayant des diamètres inférieurs à 200 nm, des indices de polydispersité (PDI) inférieurs à 0.32, et des potentiels zêta supérieurs à 19 mV. Leurs taux de transfection et d'expression de la luciférase étaient supérieurs ou égaux à 65% et 75% des polyplexes fraîchement préparés sans excipients respectivement. Finalement, les compositions n'étaient pas cytotoxiques pour la lignée cellulaire rénale HEK293 aux concentrations évaluées.

Ces connaissances ont ensuite été adaptées pour la formulation des polyplexes CS/ARNic. L'analyse de l'influence des tampons sur les compositions a démontré que les propriétés physicochimiques des polyplexes varient selon la valence de leurs contre-ions dans le tampon, selon la force ionique, et selon le pH des formulations. Les polyplexes préparés à N/P = 2 en présence d'acide maléique ou de phosphate de sodium agrégeaient lorsque le pH et/ou la force ionique augmentaient; les résultats optimaux ont été obtenus avec histidine, soit en absence de contre-ions anioniques divalents. La concentration des tampons compatibles a été optimisée pour

la lyophilisation de complexes recouverts ou non d'acide hyaluronique (HA), supplémentés de tréhalose à 0.5% m/V. Les formulations préparées à pH 6.5 ont notamment pu être lyophilisées avec 1 mM d'histidine, alors que celles préparées à pH 7 en présence de HA ont dû être lyophilisées avec au moins 2 mM de tampon pour préserver le pH. L'impact sur les polyplexes des séquences des oligonucléotides utilisés dans leur composition a été évalué. Les polyplexes formés à un faible ratio N/P avaient une stabilité plus grande pendant la lyophilisation avec les séquences d'oligodésoxynucléotides (ODN) plutôt que d'ARNic; avec celles riches en bases AT plutôt qu'en bases GC; et avec les duplex ayant des extrémités cohésives plutôt que franches. Les formulations étaient non-toxiques et préservaient leur activité biologique après réhydratation 20 fois plus concentrées. Les complexes couverts de HA, formulés à pH 7, étaient hémocompatibles.

Finalement, les cycles de lyophilisation ont été optimisés pour réduire les temps et les coûts de production des échantillons. La température de transition vitreuse de la solution cryoconcentrée (T_g') a été déterminée pour les divers excipients et formulations. Les résultats ont démontré que les polyplexes ont un effet négligeable sur la T_g' des compositions, qui est principalement influencée par les lyoprotectants, tel que prédit par l'équation de Fox. Bien que l'analyse de la microstructure des lyophilisats obtenus ait mis en évidence la présence de microaffaissement lorsque la concentration du lyoprotectant était réduite à 0.5% m/V, les temps de réhydratation des lyophilisats demeuraient acceptables (< 5 min). Les cycles de lyophilisation ont été optimisés pour les formulations contenant 0.5% m/V de tréhalose, leur dessiccation primaire étant optimale à une température de la tablette (T_s) de -32 °C et une pression de la chambre (P_c) de 60 mTorr. La lyophilisation était complète après 25 h pour les flacons remplis à une hauteur de 0.5 cm, et après 62.5 h pour ceux remplis à une hauteur de 2 cm.

Ces travaux ont permis de développer des formulations biocompatibles de complexes CS/ADN et CS/ARNic pouvant être lyophilisées et réhydratées jusqu'à 20 fois plus concentrées, cela tout en préservant leurs propriétés physicochimiques, leur activité biologique, et en demeurant isotoniques. L'ajout d'une couche de HA sur les complexes a permis d'obtenir des compositions à pH neutre ayant une hémocompatibilité accrue. La lyophilisation des échantillons a pu être optimisée, la durée des cycles variant de 25 à 62.5 h selon leur hauteur de remplissage. Ces résultats représentent une étape importante vers l'usage clinique de thérapies géniques intraveineuses à base de chitosane. Les travaux à venir devraient inclure une caractérisation plus approfondie des formulations lyophilisées, notamment l'évaluation de leur stabilité à long terme.

ABSTRACT

Research to develop safe and efficient non-viral gene delivery vectors for clinical applications has gained momentum in recent years. Chitosan (CS) is a natural cationic polysaccharide which has been successfully tailored to self-assemble with DNA or small interfering RNA (siRNA) to form polyelectrolyte complexes with high *in vitro* and *in vivo* transfection efficiencies. Despite their great therapeutic potential, CS/DNA and CS/siRNA polyplex formulations require further improvement for successful clinical applications: their concentration should be increased to reach therapeutic dosages, they should be optimized for intravenous administration, and they should be stabilized for shipping and long term storage. The goals of the thesis were: to identify biocompatible CS/DNA and CS/siRNA formulations that can be lyophilized and rehydrated to higher concentrations while preserving their properties and being isotonic; to develop hemocompatible, neutral pH, lyophilized polyplex compositions; and to optimize freeze-drying cycles for these compositions.

An initial study done with CS/DNA polyplexes, prepared at amine to phosphate (N/P) ratio of 5, showed that 3.5 mM histidine buffer (pH 6.5), combined with one of 0.5 % wt/vol sucrose, 5kDa dextran, or trehalose, was required in the formulations to prevent complex aggregation during freeze-drying. These compositions could then be rehydrated to final concentrations up to 20-fold higher (~ 1 mg of DNA/mL), while maintaining near physiological pH and tonicity. The resulting polyplexes were predominantly spherical, with diameters below 200 nm, polydispersity indexes (PDI) below 0.32, and zeta potentials above +19 mV. Rehydrated formulations had transfection efficiencies and luciferase expression levels no less than 65% and 75% of fresh polyplexes without excipients respectively. They did not affect the viability of the HEK 293 kidney cell line.

This knowledge was then adapted to CS/siRNA systems. Analysis of the influence of buffers on polyplexes showed three buffer parameters affect their physicochemical properties, namely the valency of their counterions, their ionic strength, and the formulation pH. Polyplexes prepared at N/P = 2 in maleic acid or sodium phosphate aggregated when pH and/or ionic strength increased, whereas optimal results were obtained with histidine, in absence of divalent anionic counterions. Compatible buffers were then optimized for freeze-drying of uncoated and hyaluronic acid (HA)-coated polyplexes in 0.5% wt/vol trehalose. Compositions prepared at pH 6.5 could be lyophilised with 1 mM histidine, whereas HA-coated polyplexes prepared at pH 7 had to be

supplemented with 2 mM buffer to maintain pH constant. Effects of specific oligonucleotide sequences on polyplex properties were then assessed. Polyplexes formed at a low N/P ratio displayed greater stability during freeze-drying when formed with oligodeoxynucleotides (ODNs) vs siRNAs; with AT-rich vs GC-rich sequences; and with overhangs vs blunt ends. Formulations were non-cytotoxic and they preserved their biological activity after rehydration at 20-fold their initial concentration. HA-coated formulations at pH 7 were hemocompatible.

Freeze-drying cycles were then optimized in order to reduce production times and costs. The glass transition temperature of maximally cryoconcentrated solutions (T_g') was determined for various excipients and formulations. Results showed that polyplexes had a negligible impact on overall formulation T_g' , which is mostly influenced by lyoprotectants, as predicted by the Fox equation. Although freeze-dried cake microstructures showed evidence of microcollapse upon reducing lyoprotectant concentrations to 0.5% wt/vol, product rehydration times remained acceptable (< 5 min) for all formulations. Freeze-drying cycles were then optimized for formulations containing 0.5% wt/vol trehalose, their primary drying being optimal at shelf temperature (T_s) of -32 °C and chamber vacuum (P_c) of 60 mTorr. Sample lyophilization was completed within 25 h for vials filled to a height of 0.5 cm, and within 62.5 h for those filled to a height of 2 cm.

This work allowed to develop biocompatible CS/DNA and CS/siRNA formulations that can be lyophilized and rehydrated to concentrations up to 20 times higher, while preserving their physicochemical properties, their biological activity, and remaining isotonic. Adding a HA-coating to polyplexes led to the development of composition at neutral pH with increased hemocompatibility. Freeze-drying could be optimized for these formulations, with overall cycle times varying between 25 and 62.5 h depending on vial fill height. These results represent an important step towards future clinical use of chitosan-based intravenous gene therapies. Future work would involve further characterization of the lyophilized formulations, including assessment of their long term stability.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Objectifs	5
1.2 Structure de la Thèse	5
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	6
2.1 Chitosane pour la Livraison d'Acides Nucléiques	6
2.2 Complexes Polyélectrolytes (Polyplexes).....	7
2.2.1 Polyplexes CS/ADN.....	7
2.2.2 Polyplexes CS/ARNic	9
2.2.3 Modification de Surface des Polyplexes : Acide Hyaluronique	10
2.2.4 Stabilité en Solution	12
2.3 Lyophilisation.....	13
2.3.1 Congélation	15
2.3.2 Recuit	16
2.3.3 Dessiccation Primaire.....	17
2.3.4 Dessiccation Secondaire.....	18
2.4 Excipients pour la Lyophilisation	19

2.4.1	Lyoprotectants	19
2.4.2	Tampons	21
2.4.3	Antioxydants	23
2.4.4	Agents de Masse et Tonifiants	23
2.4.5	Flacons et Bouchons.....	26
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT		27
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: PREPARATION OF CONCENTRATED CHITOSAN/DNA NANOPARTICULE FORMULATIONS BY LYOPHILIZATION FOR GENE DELIVERY AT CLINICALLY RELEVANT DOSAGES		29
4.1	Abstract	29
4.2	Keywords	30
4.3	Introduction	30
4.4	Material and Methods.....	32
4.4.1	Materials.....	32
4.4.2	Preparation of CS/DNA Nanoparticle Formulations	33
4.4.3	Freeze-Thawing, Freeze-Drying and Rehydration of Nanoparticle Suspensions	33
4.4.4	Formulation pH and Osmolality.....	35
4.4.5	Nanoparticle Size and Surface Charge Analysis.....	35
4.4.6	Nanoparticle Scanning Electron Microscopy Imaging	35
4.4.7	<i>In vitro</i> Transfection.....	35
4.4.8	Flow Cytometric Determination of Percentage of Transfection	36
4.4.9	Luminometric Determination of Luciferase Expression	37
4.4.10	Cytotoxicity Assays.....	37
4.4.11	Statistical Analysis	38

4.5	Results and Discussion.....	38
4.5.1	Optimization of Lyoprotectant Concentration	38
4.5.2	Optimization of Buffer Concentration	40
4.5.3	Optimization of Nanoparticle Concentration upon Rehydration	42
4.5.4	<i>In Vitro</i> Transfection	46
4.5.5	<i>In Vitro</i> Cytotoxicity	48
4.6	Conclusions	51
4.7	Acknowledgements	51
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: LYOPHILIZATION AND CONCENTRATION OF CHITOSAN/SIRNA POLYPLEXES: EFFECTS OF OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCE, BUFFER COMPOSITION, AND COATING WITH HYALURONIC ACID		52
5.1	Abstract	52
5.2	Keywords	53
5.3	Introduction	53
5.4	Material and Methods.....	55
5.4.1	Materials.....	55
5.4.2	Preparation of CS/NA Polyplex Formulations.....	57
5.4.3	Freeze-Drying (FD) and Rehydration of Polyplex Formulations	58
5.4.4	Polyplex Size, Surface Charge, and Concentration.....	58
5.4.5	Quantification of Free Chitosan by Orange II Assay	59
5.4.6	Oligonucleotide Condensation Assay	59
5.4.7	Polyplex Transmission Electron Microscopy Imaging	60
5.4.8	<i>In vitro</i> transfection	60
5.4.9	Cell Viability	61
5.4.10	Quantification of eGFP expression by Flow Cytometry	61

5.4.11	Hemocompatibility assays.....	62
5.4.12	Statistical Analysis	63
5.5	Results and Discussion.....	63
5.5.1	Effect of Buffer Type and Ionic Strength on Polyplexes	63
5.5.2	Optimization of Buffer Concentration for Freeze-Drying	69
5.5.3	Impact of Oligonucleotide Sequence on Freeze-Dried Polyplexes.....	71
5.5.4	<i>In vitro</i> Silencing Efficiency and Biocompatibility of Polyplexes	77
5.6	Conclusion.....	83
5.7	Author Contributions.....	83
5.8	Acknowledgements	84
5.9	Table of Contents Graphic	84
5.10	Supporting Information	84
5.10.1	ODN and siRNA Sequences	84
5.10.2	Buffer Properties and Compositions	86
5.10.3	Calculation of Formulation Ionic Strengths	90
CHAPITRE 6	OPTIMISATION DES CYCLES DE LYOPHILISATION	92
6.1	Résumé.....	92
6.2	Introduction	92
6.3	Matériel et Méthodes.....	94
6.3.1	Matériel	94
6.3.2	Préparation des Formulations.....	94
6.3.3	Mesure de la Tg' par mDSC	97
6.3.4	Lyophilisation des Échantillons	98
6.3.5	Analyse de la Congélation.....	99

6.3.6	Modélisation des Paramètres de Dessiccation Primaire.....	99
6.3.7	Optimisation des Phases de Dessiccation Primaire et Secondaire	102
6.3.8	Imagerie des Lyophilisats par Microscopie Électronique à Balayage	102
6.4	Résultats et Discussion.....	103
6.4.1	Température de Transition Vitreuse des Solutions Cryoconcentrées	103
6.4.2	Microstructure des Lyophilisats avant Optimisation du Cycle de Lyophilisation ...	105
6.4.3	Optimisation de la Congélation.....	107
6.4.4	Optimisation de la Phase de Dessiccation.....	111
6.5	Conclusions	122
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	124
CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	131
LISTE DES RÉFÉRENCES	134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Transitions vitreuses et température d'affaissement d'excipients pour la lyophilisation.	25
Table 5.1 Mixing concentrations of CS and HA to form polyplexes at different N/P and N/P/C ratios	57
Table 5.2 Ionic strength of uncoated (N/P = 2 or 5) and HA-coated (N/P/C = 2/1/1.5) polyplexes formulated at pH 6.5 using different buffers and buffer concentrations	64
Table 5.3 Buffers Structure, pKa, and Net Charge at Different pH	86
Table 5.4 Buffer Compositions with Polyplexes	88
Table 5.5 Calculation of the ionic strength contribution of polyplexes	90
Tableau 6.1 Tampons histidine pour les formulations CS/ODN et CS/ARNic.	96
Tableau 6.2 Propriétés des flacons de lyophilisation tubulaires de 10 mL de Wheaton	101
Tableau 6.3 T_g' des excipients et du chitosane	103
Tableau 6.4 T_g' modélisées et expérimentales des formulations avec ou sans complexes CS/ADN	105
Tableau 6.5 Paramètres utilisés pour modéliser la première itération de l'optimisation de la phase de dessiccation primaire.	116
Tableau 6.6 Paramètres utilisés pour modéliser la seconde itération de l'optimisation de la phase de dessiccation primaire.	119

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Structure chimique de la chitine et du chitosane.	6
Figure 2.2 Formation de polyplexes CS/ADN	7
Figure 2.3 Structure chimique de l'acide hyaluronique.	11
Figure 2.4 Diagramme de phase d'une formulation où le soluté (S) demeure amorphe pendant la congélation.	14
Figure 2.5 Lyophilisats comprenant divers ratios mannitol:sucrose	24
Figure 4.1 Freeze-Thaw (FT) evaluation of potential lyoprotectants for CS/DNA polyplexes.....	39
Figure 4.2 Optimization of histidine concentration for lyophilization of CS/DNA polyplexes. ...	41
Figure 4.3 Optimization of nanoparticle concentration by freeze-drying and rehydration to lower volumes.	43
Figure 4.4 SEM images of CS/DNA polyplexes formulated without or with excipients, after freeze-drying and rehydration to 20-fold the initial concentration (Rh20X).	45
Figure 4.5 <i>In vitro</i> percentage of transfection and luciferase expression of optimized CS/DNA formulations.	47
Figure 4.6 <i>In vitro</i> viability and metabolic activity of HEK 293 cells exposed to various concentrations of (a) CS/DNA polyplex formulations and PEI/DNA polyplexes and (b) free CS and free PEI.	49
Figure 5.1 Effect of buffer type and ionic strength on CS/ApoB-aODN nanoparticle Z-average, PDI, ZP, and pH.	66
Figure 5.2 Effect of (a) histidine and (b) sodium phosphate ionic strengths on the number average diameter, the nanoparticle concentration, the percentage of free chitosan in CS/ApoB-aODN nanoparticle formulations prepared at N/P = 2.	68
Figure 5.3 Optimization of buffer type and concentration for lyophilization and concentration of CS/ApoB-aODN nanoparticles.	70
Figure 5.4 Effect of oligonucleotide type, overhangs, and sequence on the Z-average and PDI of fresh or freeze-dried nanoparticles.	73

Figure 5.5 Effect of oligonucleotide type, overhangs, and sequence on the nucleic acid condensation efficiency of chitosan in presence of 0.5% wt/vol trehalose and 1 mM histidine at pH 6.5.	75
Figure 5.6 Identification of the isoelectric point (IEP) of various polyplexes by titration of ODN and siRNA, targeting for ApoB and eGFP, with CS.....	76
Figure 5.7 <i>In vitro</i> silencing efficiency and cytotoxicity of CS/eGFP-siRNA(N/P=5) prior to and after FD in presence or absence of 0.5% wt/vol trehalose and 1 mM histidine at pH 6.5.	78
Figure 5.8 Hemolysis (a) and hemagglutination (b) of red blood cells following incubation with serial dilutions of uncoated (N/P = 2 or 5) and HA-coated (pH 6.5 or 7) CS/ApoB-siRNA nanoparticles.....	80
Figure 5.9 TEM images of uncoated (N/P = 2 or 5) and HA-coated (pH 6.5 or 7) polyplexes, formulated in 0.5 % wt/vol trehalose and 1 or 2 mM histidine, after freeze-drying and rehydration to 20-fold the initial concentration (Rh20X)	82
Figure 5.10 Table of contents graphic.....	84
Figure 6.1 Identification de la T_g ' d'un échantillon sur la courbe du flux de chaleur réversible exprimé en fonction de la température.	97
Figure 6.2 Exemple de profils de température de la tablette (—) et de l'échantillon (— —) pendant la congélation.....	99
Figure 6.3 T_g ' expérimentales des formulations avec ou sans complexes CS/ADN.	104
Figure 6.4 Impact du choix de la formulation, notamment la nature du lyoprotectant et la concentration des excipients, sur la microstructure des lyophilisats.....	107
Figure 6.5 Profils de température de formulations de CS/ADN et CS/ODN soumis à deux cycles de congélation	109
Figure 6.6 Effet de la hauteur de remplissage de flacons de 10 mL sur le profil de température lors de la congélation de formulations de CS/ADN.....	110
Figure 6.7 Lyophilisation d'échantillons de 2 mL dans des flacons de 10 mL ($l_g = 0.57$ cm) selon un cycle de dessiccation primaire non optimisé.....	113

- Figure 6.8 Lyophilisation d'échantillons de 2 et 7 mL dans des flacons de 10 mL, soit $l_g = 0.57$ et 2 cm respectivement, selon le cycle non optimisé de dessiccation (a) primaire et (b) secondaire.....115
- Figure 6.9 Échantillons contenant 0.5 % m/V tréhalose, lyophilisés dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur l_g de 0.5 à 2 cm, selon une phase de dessiccation primaire de 48 h à $T_s = -38.4$ °C et $P_c = 50$ mTorr.118
- Figure 6.10 Échantillons contenant 0.5 % m/V tréhalose, lyophilisés dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur l_g variant de 0.5 à 2 cm, selon une phase de dessiccation primaire de 42 h à $T_s = -32$ °C et $P_c = 60$ mTorr.120
- Figure 6.11 Optimisation de la phase de dessiccation secondaire d'échantillons contenant 0.5% m/V tréhalose lyophilisés dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur l_g de 0.5 cm. .122

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

% wt/vol	g de soluté par 100 mL de solution
^1H NMR	Résonance magnétique nucléaire du proton (^1H)
Abs _{lys}	Absorbance du lysat cellulaire
Abs _{med}	Absorbance du milieu conditionné
ADN	Acide désoxyribonucléique
ApoB	Apolipoprotéine B
ARN	Acide ribonucléique
ARNic	ARN interférent court
BCA	Acide bicinchoninique
BPEI	Polyéthylèneimine ramifié
CS	Chitosane
Ctl	Contrôle
DDA	Degré de désacétylation
Dex	Dextran 5 kDa
Dil. 1X	Dilué à la concentration initiale
Dil. 10X	Dilué à 10 fois la concentration initiale
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMEM HG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose
DNA	Acide désoxyribonucléique
EDTA	Acide éthylènediamine-tétraacétique
eGFP	Protéine fluorescente verte améliorée (enhanced GFP)
EGFP	Protéine fluorescente verte améliorée (enhanced GFP)
eGFP ⁺	Exprimant la protéine fluorescente verte améliorée

EGFPLuc	Protéine hybride exprimant EGFP et Luc
EMCCD	Dispositif à transfert de charges multiplicateur d'électrons (electron multiplying charge coupled device)
FBS	Sérum de fœtus de bovin
FD	Lyophilisateur (freeze-dryer), lyophilisation (freeze-drying), lyophilisé(e) (freeze-dried)
FSC	Diffusion vers l'avant (forward scatter)
GPC	Chromatographie sur gel
H	L-histidine
H1299	Lignée cellulaire de carcinome du poumon non à petites cellules
HA	Acide hyaluronique (sodium hyaluronate)
HCl	Acide chlorhydrique
HEK293	Lignée cellulaire rénale humaine embryonnaire
His	L-histidine
IEP	Point isoélectrique
IM	Intramusculaire
IV	Intraveineux
LDH	Lactate déshydrogénase
LDV	Vélocimétrie laser Doppler
Luc	Luciférase
MA	Acide maléique
MALS	Diffusion de la lumière multi-angle
mDSC	Calorimétrie à balayage différentiel modulé
MES	Acide 2-morpholino-éthanesulfonique
M _n	Masse molaire (moléculaire) moyenne en nombre

mOsm	Milliosmole
NP	Nanoparticule
N/P	Ratio molaire des groupements amines protonables du polycation (chitosane, PEI) par rapport aux groupements phosphates de l'acide nucléique (ADN, ARNic, etc.)
N/P/C	Ratio molaire des groupements amines protonables du polycation (chitosane, PEI) par rapport aux groupements phosphates de l'acide nucléique (ADN, ARNic, etc.), par rapport aux groupements carboxyles du polyanion (acide hyaluronique).
M _v	Masse molaire (moléculaire) moyenne viscosimétrique
M _w	Masse molaire (moléculaire) moyenne en poids
MW	Masse molaire
NTA	Analyse de suivi individuel de particules (<i>Nanoparticle Tracking analysis</i>)
ODN	Oligodéoxynucléotide
P	Sodium phosphate
PBS	Tampon phosphate salin
P _c	Pression de la chambre du lyophilisateur
PDI	Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PFH	Hémoglobine sans plasma
PLL	Poly-L-lysine
Rh1X	Reconstitué à la concentration initiale
Rh10X	Reconstitué à 10 fois la concentration initiale
Rh20X	Reconstitué à 20 fois la concentration initiale
RI	Indice de réfraction
RLU	Unité relative de lumière

RNase	Ribonucléase
rpm	Rotations par minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 (milieu de culture)
RT	Température ambiante
SC	Sous-cutanée
SEM	Microscopie électronique à balayage
siRNA	ARN interférent court
SSC	Diffusion latérale
Suc	Sucrose
TBHD	Échantillon de sang dilué à 10 ± 1 mg d'hémoglobine par mL
T _c	Température d'affaissement (<i>collapse</i>)
T _e	Température eutectique
TEM	Microscopie électronique à transmission
T _g	Température de transition vitreuse
T _g '	Température de transition vitreuse des solutions cryoconcentrées
TMA	Tris-Acide maléique
T _p	Température du produit
Tre	Tréhalose dihydrate
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
T _s	Température de la tablette (<i>shelf</i>)
UV	Ultra-violet
ZP	Potentiel Zêta

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique à l'intérieur de cellules à des fins thérapeutiques : les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques messagers (mRNA) sont utilisés pour exprimer des protéines dont les gènes sont défectueux; les acides ribonucléiques interférents courts (ARNic) sont utilisés pour inhiber l'expression de protéines spécifiques dans les cellules hôtes. Plusieurs barrières extracellulaires et intracellulaires limitent toutefois l'efficacité de la livraison du matériel génétique non protégé. En effet, les acides nucléiques doivent résister à la dégradation par les nucléases et le système immunitaire; ils doivent pénétrer diverses structures dont l'endothélium et la membrane plasmique; ils doivent résister à l'hydrolyse acide lors du transit endolysosomal, puis être libérés dans le cytoplasme; et, dans le cas de l'ADN, ils doivent migrer vers le noyau et y entrer (Al-Dosari & Gao, 2009). Plusieurs types de vecteurs viraux et non viraux, dont les lipides et polymères cationiques et les conjugués biomoléculaires, ont été développés pour résoudre cette situation. Malgré l'efficacité élevée des vecteurs viraux, ces derniers engendrent généralement une réponse immunitaire adaptative (Al-Dosari & Gao, 2009). Les lipides cationiques, quant à eux, causaient historiquement des réponses inflammatoires aiguës, d'où les efforts consacrés au développement des conjugués biomoléculaires et des polymères cationiques (Al-Dosari & Gao, 2009; Winkler, 2013).

Le chitosane (CS) est un polysaccharide cationique naturel dont les propriétés peuvent être ajustées afin de promouvoir la formation de polyplexes de stabilité variable en présence d'ADN plasmidique. Des études *in vitro* ont démontré que l'efficacité de transfection des complexes CS/ADN est fonction du poids moléculaire (MW) du chitosane utilisé, de son degré de désacétylation (DDA), du pH, et du ratio molaire des groupements amines du chitosane par rapport aux groupements phosphates de l'ADN (N/P) dans la formulation (Lavertu, Marc et al., 2006; Nimesh et al., 2010; Thibault, Marc et al., 2011; Thibault, M. et al., 2010). La modulation de ces paramètres permet d'ailleurs de produire des polyplexes ayant diverses applications *in vivo*, notamment l'expression de protéines recombinantes thérapeutiques ou la production d'anticorps contre les protéines exprimées, qui agissent donc comme un antigène (Jean, M. et al., 2011; Jean, M. et al., 2009). Suite à la découverte des ARN interférents courts (ARNic) et de leur implication dans la régulation de l'expression protéique, de nombreux efforts ont été déployés

afin de développer des polyplexes chitosane/ARNic permettant d'exploiter le potentiel thérapeutique de ces oligonucléotides (Alameh et al., 2012; Holzerny et al., 2012; Jean, Myriam et al., 2012). Les résultats ont toutefois démontré que des ratios N/P plus élevés et des chitosanes de poids moléculaires supérieurs devaient être utilisés pour stabiliser ces systèmes et maximiser leur efficacité de silençage (Howard et al., 2006; Liu, X. et al., 2007; Malmo et al., 2012). Des études réalisées avec des cations multivalents et divers types d'oligonucléotides supporteraient ces observations : les duplex d'ARN ayant une conformation hélicoïdale plus compacte que les duplex d'ADN, ils seraient plus difficiles à condenser étant donné un positionnement différent de leurs groupements phosphates (Tolokh et al., 2014; Wu et al., 2015; Xu & Anchordoquy, 2011). De plus, il a été démontré que le contenu en AT/GC de courtes séquences d'ADN affectait l'efficacité avec laquelle les polyamines arrivaient à condenser ces duplex (Kabir & Suresh Kumar, 2013). Malgré ces observations, aucune étude n'a été réalisée pour évaluer l'impact potentiel des séquences des oligonucléotides sur leur condensation par le chitosane, donc sur les propriétés des polyplexes résultants.

À ce jour, des formulations de polyplexes de CS/ADN et de CS/ARNic ont été rapportées dans plus de 50 études animales (Buschmann et al., 2013; Corbet et al., 2016; Danhier et al., 2015; He et al., 2015; Van Woensel et al., 2016; Xie et al., 2014; Yhee et al., 2015). Malgré les résultats encourageants obtenus pour les diverses voies d'administration étudiées, soit intramusculaire, orale, intranasale, etc., l'injection intraveineuse de concentrations élevées de polyplexes cationiques demeure problématique. En effet, en absence de modifications de surface, les complexes faits de chitosane peuvent causer de l'hémolyse et de l'héماغglutination (Carreño-Gómez & Duncan, 1997; Rao & Sharma, 1997). Bien que plusieurs types de modifications de surface permettent d'éliminer le caractère hémotoxique de ces polyplexes, une approche relativement simple, mais peu caractérisée antérieurement, est le recouvrement des polyplexes CS/acide nucléiques préalablement formés avec de l'acide hyaluronique (HA). Les fonctions carboxyle de ce glycosaminoglycane anionique non toxique peuvent en effet former des liaisons électrostatiques avec les fonctions amine du chitosane à la surface des polyplexes. Puisque le HA est aussi un important ligand du récepteur CD44, qui est surexprimé dans plusieurs cellules cancéreuses, il a été largement étudié en tant qu'agent de ciblage thérapeutique (Platt & Szoka, 2008).

Malgré le potentiel prometteur des thérapies à base de polyplexes CS/ADN et CS/ARNic, certains facteurs limitent actuellement l'usage de ces thérapies en clinique. Dans un premier temps, ces systèmes autoassemblés devant être préparés à faibles concentrations (~ 50 à 100 µg d'acide nucléique/mL) afin d'assurer une production uniforme de polyplexes de haute qualité, les doses finales atteignables sont restreintes (MacLaughlin et al., 1998; Xu & Anchordoquy, 2011). De plus, ces polyplexes ont une stabilité limitée en solution lorsqu'ils sont entreposés à température ambiante, leur taille augmentant et leur efficacité de transfection diminuant en quelques semaines (Romøren et al., 2004). Or, la préparation des polyplexes en clinique avant injection introduit un risque élevé de variabilité de l'efficacité des formulations, les contrôles qualité pouvant être effectués sur ces dernières étant sérieusement limités (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001; Kasper et al., 2011). Les formulations pourraient être entreposées et transportées à 4 °C, toutefois cette alternative présente des inconvénients techniques et financiers non négligeables (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). La lyophilisation est une alternative qui mérite d'être étudiée davantage puisqu'elle pourrait non seulement résoudre le problème de stabilité des polyplexes à température ambiante, mais aussi permettre d'augmenter leur concentration avant administration à au moins 1 mg d'acide nucléique/mL (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005). En effet, bien que ce processus de déshydratation à basse température soit généralement utilisé par l'industrie pharmaceutique pour stabiliser des molécules thérapeutiques à long terme, les produits lyophilisés peuvent être réhydratés dans des volumes réduits pour en augmenter la dose.

Les formulations devant être lyophilisées sont habituellement modifiées à l'aide d'excipients particuliers afin de prévenir leur dégradation pendant la congélation et la dessiccation. Lors de la congélation, l'eau cristallise, ce qui entraîne une augmentation de la concentration des espèces en solution dans la solution environnante. Cette phase cryoconcentrée est propice à la dégradation physique et chimique des polyplexes (Kasper et al., 2011). Des lyoprotectants sont typiquement ajoutés aux nanoparticules afin d'éviter leur agrégation irréversible et maintenir leur activité biologique; ils formeraient une matrice amorphe autour des polyplexes et formeraient des liaisons hydrogène stabilisatrices avec leurs groupements polaires suite au retrait de l'eau (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). Des études de gel-dégel permettent de rapidement identifier des lyoprotectants potentiellement compatibles avec les polyplexes pendant la lyophilisation, lesquels peuvent être des disaccharides, des

oligosaccharides, des polysaccharides, voire même des polymères (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Anchordoquy, T. J. & Koe, 2000; Hinrichs et al., 2006; Kwok et al., 2000; Liu, J. S., 2006; Schersch et al., 2009; Schwarz & Mehnert, 1997; Wang, 2000). Des tampons sont souvent ajoutés aux formulations afin de stabiliser leur pH dans la phase cryoconcentrée, afin d'éviter l'hydrolyse des nanoparticules, ou dans la solution finale réhydratée, afin d'éviter que leur charge en surface soit modifiée (Tang & Pikal, 2004). Le choix des tampons est critique, car ils doivent être compatibles avec un usage clinique, ils ne doivent pas causer l'aggrégation des polyplexes, et ils ne doivent pas cristalliser ou précipiter à basse température pour éviter les changements brusques de pH pendant la lyophilisation (Bhatnagar et al., 2007; Gómez et al., 2001; Shalaev et al., 2002; Sundaramurthi et al., 2010; Tang & Pikal, 2004). De plus, la procédure visant à augmenter de 10 à 20 fois la dose d'acide nucléique dans les formulations réhydratées pour leur usage en clinique, il est critique de limiter les quantités initiales d'excipients utilisées pour la lyophilisation afin que les injections finales soient quasi isotoniques (p. ex. 10% sucrose) (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). Une étude antérieure ayant démontré qu'un minimum de 5% sucrose était nécessaire pour préserver l'efficacité de silençage de complexes CS/ARNic pendant la lyophilisation, il est évident qu'un travail d'optimisation de ces formulations est nécessaire afin d'être en mesure de les concentrer suffisamment sans qu'elle ne deviennent hypertoniques (Andersen et al., 2008).

Finalement, malgré son usage répandu, la lyophilisation demeure un processus coûteux pour l'industrie, compte tenu de la durée des cycles, qui s'échelonne habituellement sur plusieurs jours, et de l'énergie requise pour maintenir les basses températures et les vides poussés pendant les cycles (Petrides et al., 2011; Tang & Pikal, 2004). Afin d'assurer une bonne homogénéité entre les lyophilisats tout en minimisant leurs temps de production, chacune des trois étapes principales des cycles, soit la congélation, la dessiccation primaire, et la dessiccation secondaire, doit être optimisée. L'étape la plus longue du cycle demeure toutefois la dessiccation primaire, c'est-à-dire la sublimation de la glace dans les formulations. Or, il a été démontré que, pour chaque augmentation de la température du produit de 1 °C pendant cette étape, le temps moyen de sublimation était réduit d'environ 13% (Pikal, M. J., 1990). La température de transition vitreuse des formulations cryoconcentrées (T_g'), qui se situe généralement quelques degrés sous leur température d'affaissement, est généralement utilisée pour optimiser les cycles de lyophilisation (Tang & Pikal, 2004). La T_g' , qui est directement fonction du contenu en soluté

dans les formulations, peut être approximée par l'équation de Fox lorsque les composantes demeurent amorphes pendant la congélation (Österberg & Wadsten, 1999). Tang et Pikal ont proposé une méthode qui permet d'optimiser les cycles de lyophilisation en fonction de la T_g' , de la température cible du produit, de la hauteur de remplissage des flacons, et de la concentration en soluté (Tang & Pikal, 2004). Il serait donc pertinent de valider que les formulations optimales établies pour la lyophilisation des polyplexes CS/ADN et CS/ARNic peuvent être produites dans des temps raisonnables, et ainsi être commercialement viables.

1.1 Objectifs

L'objectif principal de la thèse est d'identifier des formulations biocompatibles permettant de lyophiliser et réhydrater des polyplexes de CS/ADN et de CS/ARNic à des concentrations d'ordre clinique, soit au moins 1 mg d'acide nucléique/mL, tout en demeurant quasi isotoniques et en préservant leurs propriétés physicochimiques et leur activité biologique. Il s'agit aussi de développer des formulations lyophilisées de polyplexes couverts de HA dont le pH est neutre et l'hémocompatibilité est accrue. Les travaux visent aussi à examiner la possibilité d'utiliser les ODNs comme remplacement abordable des ARNic pour effectuer le criblage préliminaire des compositions pour la lyophilisation, de même qu'évaluer l'impact des variations de séquence sur les formulations de polyplexes. Finalement, l'objectif final de la thèse est d'optimiser la production des lyophilisats à l'aide de modèles permettant respectivement d'estimer la T_g' des formulations et de minimiser la durée des cycles de lyophilisation.

1.2 Structure de la Thèse

La thèse débute par une revue critique de la littérature, présentée dans le Chapitre 2, qui couvre les sujets pertinents à la formulation et à la lyophilisation de polyplexes CS/ADN et CS/ARNic. Le chapitre 3 présente ensuite la démarche de l'ensemble du travail réalisé afin d'atteindre les objectifs de la thèse énoncés dans la section 1.1. Les 3 chapitres suivants constituent le corps de la thèse; ils prennent la forme d'un article publié, d'un article soumis, et d'un chapitre rédigé selon le même format que les articles. Une discussion générale des résultats est ensuite présentée, suivie d'une conclusion et de recommandations.

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Chitosane pour la Livraison d'Acides Nucléiques

Le chitosane est un polymère linéaire biocompatible et biodégradable obtenu par désacétylation alcaline de la chitine. La chitine, qui se retrouve dans la carapace des crustacés, dans l'exosquelette des insectes, dans les champignons, dans les levures, est le deuxième polymère naturel le plus abondant après la cellulose (Rinaudo, 2006). Les structures chimiques de la chitine et du chitosane sont très similaires, et sont formées d'unités D-glucosamine (unité **D**) et/ou N-acétyle-D-glucosamine (unité **A**), unies par des liens glycosidiques β -(1,4) (Figure 2.1). Ces polymères se différencient l'un de l'autre par leur degré de désacétylation (DDA), soit leur fraction molaire d'unité D-glucosamine : $DDA = (100 \times \mathbf{D} / (\mathbf{D} + \mathbf{A}))$ (Buschmann et al., 2013). Selon Rinaudo, le terme chitosane doit être utilisé lorsque le DDA de la chitine excède 50% (Rinaudo, 2006).

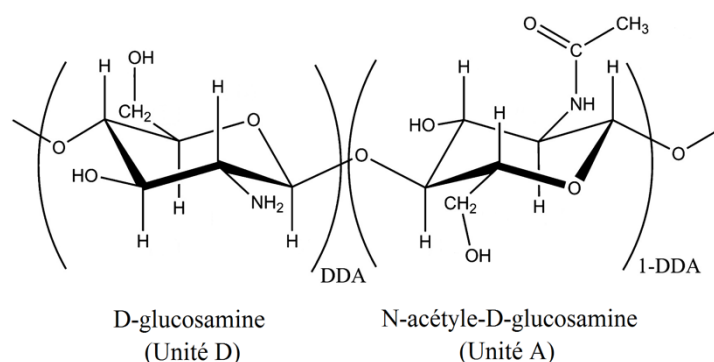


Figure 2.1 Structure chimique de la chitine et du chitosane. La chitine est formée majoritairement d'unités N-acétyle-D-glucosamine ($DDA \leq 50\%$), alors que le chitosane est formé majoritairement d'unités D-glucosamine ($DDA > 50\%$). Adapté de (Buschmann et al., 2013). Copyright 2016, avec la permission d'Elsevier.

Le chitosane ayant un pK_{ap} de ~ 6.5 , les fonctions amine des unités D-glucosamine sont chargées positivement en milieu aqueux acide, ce qui le rend soluble (Filion et al., 2007; Richard et al., 2013). Les fonctions amine protonées du chitosane lui permettent aussi d'interagir spontanément avec les groupements phosphates négativement chargés des acides nucléiques, formant ainsi des complexes polyélectrolytes, ou polyplexes, par interactions électrostatiques (Figure 2.2). Ce

polycation suscite ainsi beaucoup d'intérêt à titre de vecteur non viral de livraison de matériel génétique tel que l'ADN, les oligodésoxynucléotides (ODN) et les ARN^{ic} (Mao, S. et al., 2010).

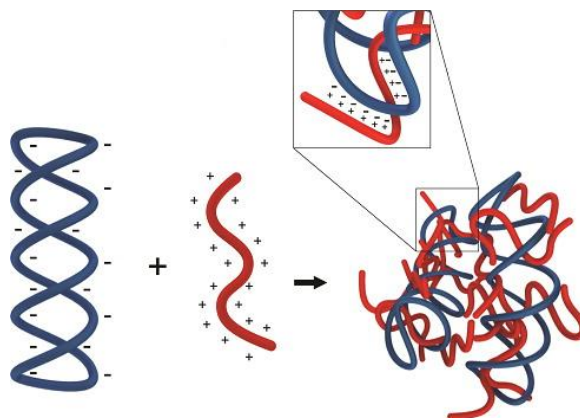


Figure 2.2 Formation de polyplexes CS/ADN par interactions électrostatiques entre les groupements amines protonés du chitosane et les groupements phosphates anioniques de l'ADN. Adapté de (Richard et al., 2013), avec permission. Copyright 2016, American Chemical Society.

2.2 Complexes Polyélectrolytes (Polyplexes)

2.2.1 Polyplexes CS/ADN

L'impact de plusieurs paramètres sur les propriétés physicochimiques et l'efficacité de transfection des polyplexes CS/ADN a été étudié en détail au cours des dernières années. La masse molaire du CS (MW), comparativement au degré de désacétylation (DDA) et au ratio amine/phosphate (N/P) entre le CS et l'acide nucléique, influence davantage la taille des complexes formés (Lavertu, Marc et al., 2006; Mao, S. et al., 2010). Une étude a démontré que le potentiel zêta (ZP) des polyplexes passait d'une valeur négative (-20 mV) à une valeur positive lorsque le ratio N/P passait de 0 à ~ 1.5, puis augmentait de 10 mV avec l'augmentation du ratio N/P de 1.5 à 12 (Mao, H.-Q. et al., 2001). Deux études indépendantes ont en fait démontré que le ratio N/P dans les complexes est d'environ 1.4 (Ma, Pei Lian et al., 2010a; Richard et al., 2013), expliquant ainsi les observations précédentes : l'augmentation abrupte du ZP de N/P = 0 à 1.5 correspondant à la neutralisation des charges négatives de l'ADN par le CS; l'augmentation graduelle du ZP au-delà de N/P = 1.5 étant possiblement due à l'augmentation progressive du ratio N/P dans les complexes en présence du large excès de CS libre dans la formulation. Le ZP diminue aussi avec l'augmentation du pH de la solution ou la diminution du DDA du CS, ces

facteurs influençant le degré d'ionisation du CS (Huang et al., 2005; Lavertu, Marc et al., 2006; Mao, H.-Q. et al., 2001; Richard et al., 2013).

Le contrôle du DDA et du MW permet d'optimiser la densité de charges du CS, donc son affinité pour l'ADN, afin que les polyplexes aient un niveau de stabilité intermédiaire favorisant la transfection (Kiang et al., 2004; Lavertu, Marc et al., 2006; Ma, P. L. et al., 2009; Strand et al., 2010; Thibault, M. et al., 2010). L'expression transgénique est maximisée *in vitro* en diminuant le DDA et en augmentant le MW, ou en augmentant le DDA et en diminuant le MW (Lavertu, Marc et al., 2006). Un excès de chitosane libre dans les formulations est aussi nécessaire *in vitro* pour assurer la libération des polyplexes des lysosomes (Thibault, Marc et al., 2011). Ainsi, les polyplexes formés à N/P = 5 avec le CS 92-10 (DDA-MW) ont une stabilité intermédiaire qui permet leur dissociation à la sortie des lysosomes, maximisant le niveau de transfection *in vitro* (Thibault, M. et al., 2010). Un milieu de transfection légèrement acide, idéalement à pH 6.5, supplémenté de 10% FBS permet de maximiser la transfection *in vitro* des complexes CS/ADN (Ishii et al., 2001; Lavertu, Marc et al., 2006; Nimesh et al., 2010; Sato et al., 2001). Diverses formulations (CS 92-10, CS 80-10 ou CS 80-80; ratios N/P = 5 ou 10; plasmides pVax1-4sFGF2, pVax1-PDGF-BB ou pVax1-GLP-1) évaluées *in vivo* ont démontré qu'un faible MW et un DDA élevé maximisent l'expression protéique à partir du vecteur (Jean, M. et al., 2011; Jean, M. et al., 2009), alors qu'une augmentation du MW ou une réduction du DDA stimulent la production d'anticorps contre la protéine exprimée, selon le site d'injection (Jean, M. et al., 2009). En effet, l'administration intramusculaire d'un CS de MW plus élevé favoriserait le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes étant donnée sa dégradation plus lente, donc la production d'anticorps contre les protéines exprimées au site d'injection; l'usage d'un DDA plus faible par voie sous-cutanée favoriserait une libération et une expression assez rapide de l'ADN pour qu'une réponse immunitaire adaptative se développe simultanément à la production des protéines (Jean, M. et al., 2009).

Malgré ces résultats *in vivo* encourageants, les polyplexes formés par interactions électrostatiques spontanées doivent habituellement être préparés à des concentrations diluées afin d'en contrôler la taille et la polydispersité. Les résultats de MacLaughlin et al. ont en fait démontré que les polyplexes CS/ADN, formés à N/P 2 ou 6, avec des CS de 32 à 102 kDa (M_w) ayant un DDA de ~ 80%, doivent être préparés à une concentration finale d'ADN inférieure ou égale à 100 µg/mL

afin que les complexes aient des tailles inférieures ou égales à 200 nm (MacLaughlin et al., 1998).

2.2.2 Polyplexes CS/ARNic

Au même titre que les complexes CS/ADN, la taille des polyplexes CS/ARNic est influencée par le MW et le DDA du CS. Liu et al. ont observé que les polyplexes CS/ARNic ($N/P = 50$), dont l'ARNic était spécifique pour la protéine EGFP (ARNic anti-EGFP), étaient agrégés s'ils étaient formés avec un chitosane de ~ 10 kDa, mais avaient des tailles de ~ 200 nm avec des CS de 64.8 à 170 kDa (78 à 84% DDA) (Liu, X. et al., 2007). La taille et la distribution des tailles (PDI) des polyplexes formés avec le CS de 114 kDa (84% DDA) à des ratios N/P de 6 à 285, dans un tampon d'acétate de sodium (pH 4.5) à 200 mM, étaient d'ailleurs stables pendant 24 h, à 25 °C, en présence de 150 mM NaCl (Howard et al., 2006). Les résultats obtenus par Malmo et al. semblent toutefois démontrer que l'effet du M_n (M_w) et du ratio N/P sur la taille des polyplexes CS/ARNic(anti-EGFP) est moins marqué lorsque le DDA = 100% (Malmo et al., 2012). En effet, ils ont observé des polyplexes dont la taille variait entre 34 et 95.4 nm; les tailles augmentaient avec l'augmentation du M_n (M_w) de 10.8 (16.4) à 64.1 (141.6) kDa, et avec l'augmentation du ratio N/P de 10 à 60. Le ZP des polyplexes CS/ARNic dépend aussi du MW et du DDA du CS, de même que du ratio N/P utilisé dans les formulations : à DDA et ratio N/P constants, le ZP augmente avec l'augmentation du MW (M_w) (Liu, X. et al., 2007); à MW et ratio N/P constants, le ZP diminue avec la réduction du DDA (Liu, X. et al., 2007); à DDA et MW (M_r) constants, le ZP augmente jusqu'à une valeur maximale (~ 30 mV à $N/P = 23$), après laquelle le ZP demeure constant malgré l'augmentation du ratio N/P (Howard et al., 2006). De plus, comme observée précédemment pour les complexes CS/ADN, la taille des polyplexes CS/ARNic augmente avec la concentration finale d'ARNic dans les formulations, limitant ainsi les doses atteignables (en mg d'ARNic/mL) lors de la production de ces polyplexes (Howard et al., 2006).

Étonnamment, le niveau de silençage *in vitro* semble maximisé par des ratios N/P très élevés, soit de 36 à 150, ce qui est en contradiction avec les observations trouvées pour l'ADN selon lesquelles une stabilité intermédiaire des complexes est requise pour favoriser leur transfection (Howard et al., 2006; Liu, X. et al., 2007; Malmo et al., 2012). En effet, les polyplexes CS/ARNic(anti-EGFP) préparés à $N/P = 50$ avec les CS de 64.8 à 170 kDa (78 à 84% DDA) avaient un taux de silençage de 45 à 65% 48 h après la transfection de cellules EGFP⁺ H1299

avec 50 nM d'ARNic (Liu, X. et al., 2007); ceux préparés avec le CS de 114 kDa (84% DDA) à N/P = 150 avaient un taux de silençage atteignant ~80% (Howard et al., 2006; Liu, X. et al., 2007). Cette dernière formulation affichait un niveau de silençage de 43% dans les cellules épithéliales des bronchioles d'un modèle murin EGFP⁺ lorsqu'administrée par voie intranasale (Howard et al., 2006). L'augmentation du DDA à 100% améliorait l'efficacité de silençage *in vitro* des polyplexes préparés à un ratio N/P moindre; les complexes CS/ARNic, formés à N/P = 30 avec un CS de M_n = 39.8 kDa (M_w = 74.5 kDa), affichaient des niveaux de silençage de 90 à 95%, 48 h après la transfection de cellules EGFP⁺ H1299 avec 45 à 100 nM d'ARNic respectivement (Malmo et al., 2012). De plus, indépendamment du CS utilisé (M_n = 10.8 à 64.1 kDa, M_w = 16.4 à 141.6 kDa, DDA = 100%), les polyplexes formés à N/P = 10 ou 60 avaient un effet négligeable sur l'intégrité des membranes et l'activité métabolique des cellules 48 h après leur transfection (Malmo et al., 2012).

Des résultats récemment publiés ont permis de démontrer que des polyplexes CS/ARNic préparés à des ratios N/P de 5 ou 10, avec un CS de ~10 kDa (80 ou 92% DDA), permettaient d'atteindre des taux de silençage élevés *in vitro* (Alameh et al., 2012; Jean, Myriam et al., 2012). Contrairement aux études préalablement discutées, la caractérisation physicochimique des formulations présentées dans ces travaux a été effectuée sur des polyplexes formés avec des oligodésoxynucléotides (ODN) simulant les ARNics utilisés par la suite dans les études *in vitro*. Les polyplexes sphériques obtenus avec 3 ODNs différents avaient des tailles inférieures à 100 nm, des PDI inférieurs à 0.3, et des ZP supérieurs à 15 mV (Alameh et al., 2012; Jean, Myriam et al., 2012). Les polyplexes équivalents obtenus avec les ARNics affichaient des taux de silençage *in vitro* variant de ~ 50 à 80%, de même que des niveaux de cytotoxicité faibles ou négligeables, selon les protéines visées et les lignées cellulaires utilisées (Alameh et al., 2012).

2.2.3 Modification de Surface des Polyplexes : Acide Hyaluronique

Plusieurs types de modifications du CS ou des CS/acides nucléiques ont été proposées afin d'améliorer les propriétés physicochimiques ou l'efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* des polyplexes (Buschmann et al., 2013; Mao, S. et al., 2010). En fait, malgré le potentiel de ces polyplexes *in vivo*, leur administration par voie intraveineuse demeure limitée à l'usage de faibles doses étant données l'hémolyse et l'héماغglutination potentielle des érythrocytes en contact avec le CS. En effet, le chlorhydrate de chitosane (M_v = 60 à 130 kDa, DDA = 81 à 85%) causerait

plus de 5% d'hémolyse après 1 h d'incubation dans le sang à des concentrations de 1 mg/mL ou plus, et causerait 100% d'hémolyse après 24h d'incubation (Carreño-Gómez & Duncan, 1997). De plus, le CS serait responsable de l'agrégation des globules rouge, soit l'hémagglutination, ce même à des concentrations très faibles en polycation (Rao & Sharma, 1997). Les interactions entre les charges cationiques du CS et les charges anioniques à la surface des érythrocytes seraient responsables de l'hémagglutination, induisant ainsi des contraintes sur les membranes cellulaires qui favoriseraient leur rupture (Carreño-Gómez & Duncan, 1997; Rao & Sharma, 1997).

L'acide hyaluronique (HA) peut être utilisé pour modifier la surface des complexes à base de chitosane afin d'améliorer leur hémocompatibilité. Il s'agit d'un glycosaminoglycane anionique très hydrophile, de masse molaire élevée, qui est commun dans les tissus biologiques, les matrices extracellulaires, les humeurs aqueuse et vitrée, le synovium, etc. (Necas et al., 2008; Rowe et al., 2009) Il est donc non toxique et non immunogénique, et possède même des propriétés anti-inflammatoires (Necas et al., 2008). La pharmacocinétique du HA après injection intraveineuse (IV) est bien documentée chez l'adulte humain: il a une demi-vie en circulation de 2 à 6 min, et un turnover de 10 à 100 mg/jour; il est principalement éliminé dans le foie par un mécanisme d'endocytose.

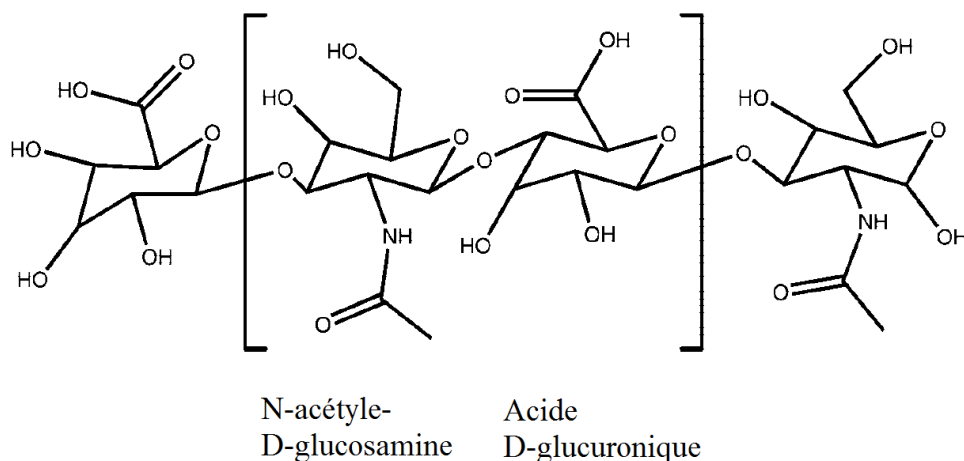


Figure 2.3 Structure chimique de l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est formé d'unités N-acétyle-D-glucosamine et acide D-glucuronique, unies par des liens glycosidiques β -(1,4) et β -(1,3) en alternance. Adapté de (Platt & Szoka, 2008), avec permission. Copyright 2016, American Chemical Society.

Le HA est un polyanion formé d'unités N-acétyle-D-glucosamine et acide D-glucuronique, qui sont liées par des liaisons glycosidiques alternées β -(1,4) et β -(1,3) (Figure 2.3). Les fonctions carboxyles des unités acide D-glucuronique ayant un pK_a très acide ($pK_a \leq 4$), HA est négativement chargé à pH égal ou supérieur à 5, et donc il peut se lier spontanément par interactions électrostatiques aux groupements amines cationiques du chitosane. La constante d'affinité du HA pour le chitosane étant ~ 200 fois inférieure à celle l'ADN, HA ne causerait pas la libération de l'ADN lorsqu'il est ajouté sur les polyplexes de CS/ADN (Ma, Pei Lian, 2010). Il n'empêcherait pas non plus le chargement de complexes HA/CS préalablement formés avec des acides nucléiques. Certaines études ont en effet rapporté la formation de complexes HA/CS, avec ou sans réticulation à l'aide de tripolyphosphate (TPP), suivie de leur chargement avec des acides nucléiques (Almalik et al., 2013; Duceppe & Tabrizian, 2009; Lu et al., 2011). La présence de HA favoriserait la formation de polyplexes plus sphériques et uniformes, ayant une solubilité accrue à des pH plus élevés. De plus, le HA se liant au récepteur CD44 souvent surexprimé à la surface et dans la matrice des cellules cancéreuses, il peut agir en tant que molécule d'adressage des polyplexes (Platt & Szoka, 2008).

2.2.4 Stabilité en Solution

Les polyplexes en solution aqueuse s'agrègent avec le temps, ce qui est défavorable d'un point de vue pharmaceutique, les caractéristiques physiques et chimiques des formulations n'étant pas préservées (Anchordoquy, T. J. & Koe, 2000). Même en absence d'aggrégation, des altérations structurales à l'intérieur des complexes cationiques peuvent affecter leur activité biologique (Anchordoquy, T. J. & Koe, 2000; Sharma et al., 2005). Malgré les nombreuses études effectuées pour caractériser et optimiser le potentiel thérapeutique des polyplexes CS/acides nucléiques, seules quelques études se sont intéressées à leur stabilité à long terme.

En solution dans le tampon phosphate salin (PBS), les polyplexes CS/ADN se dissocient après quelques heures seulement. En les conjuguant au polyéthylène glycol (PEG), il est possible de les stabiliser et de préserver leur activité biologique au-delà d'un mois en les entreposant dans une solution de 50% sucrose (Leong et al., 1998). Romøren et al. ont étudié la stabilité de complexes CS/ADN et de CS non complexés (MW : 6.6 – 160 kDa, DDA : 68 – 87%) sur une durée de 1 an, dans un tampon d'acétate de sodium à 25 mM et pH 5.5, à des températures de 4, 25 et 45 °C (Romøren et al., 2004). Après 1 an à 4°C, la taille des polyplexes était préservée et leur efficacité

de transfection demeurait supérieure à 80%; après 1 an à 25 °C, la taille finale des polyplexes n'excédait pas leur taille initiale de plus de 50%, alors que leur activité biologique était négligeable. Le ZP des polyplexes entreposés à 4 ou 25 °C demeurait supérieur à 11.7 mV après 52 semaines. À 45 °C, toutes les formulations de polyplexes agrégeaient et leur efficacité de transfection était nulle en moins de 15 semaines; leur ZP était inférieur à 2 mV après 22 semaines. Malgré une dégradation partielle du CS entreposé en solution à 4 ou 25 °C pendant 1 an, la taille et l'efficacité de transfection des polyplexes formés avec ces CS étaient similaires à celles mesurées pour des polyplexes préparés avec des nouvelles solutions de CS. Ce n'était toutefois pas le cas du CS entreposé à 45 °C. Ces résultats suggèrent qu'une dégradation du CS dans les polyplexes serait possible selon les conditions d'entreposage.

2.3 Lyophilisation

Bien que la congélation de polyplexes permette de les stabiliser pour des durées plus importantes, maintenir ces formulations à basse température pendant le transport et l'entreposage à long terme présente des inconvénients majeurs (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). La déshydratation des formulations par lyophilisation permet de résoudre cette problématique tout en stabilisant les complexes sur de longues périodes. Le but du procédé est d'obtenir une formulation solide préservant les propriétés des complexes, pouvant être réhydratée rapidement, et ayant un taux d'humidité résiduelle inférieur à 1% pour assurer une bonne stabilité à long terme (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006). La lyophilisation consiste principalement en trois étapes : la congélation, la dessiccation primaire et la dessiccation secondaire. Dépendamment du contenu en excipients, une quatrième étape, le recuit, peut être ajoutée entre la congélation et la dessiccation afin d'optimiser le processus. Les trois principales étapes de la lyophilisation, de même que certains concepts qui seront discutés dans les sections subséquentes (T_g' , T_e , T_g , etc.), sont présentées schématiquement sur la Figure 2.4.

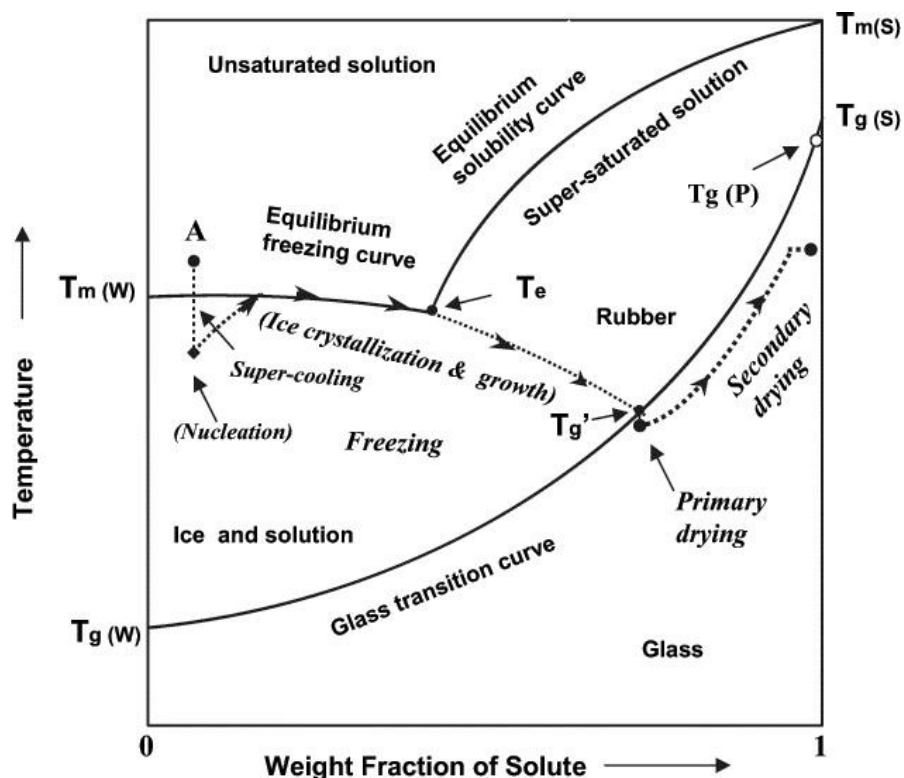


Figure 2.4 Diagramme de phase d'une formulation où le soluté (S) demeure amorphe pendant la congélation. Les flèches indiquent le processus de lyophilisation. A représente la solution aqueuse devant être lyophilisée; $T_m(W)$ et $T_m(S)$ sont la température de fusion de l'eau et du soluté respectivement; $T_g(W)$ et $T_g(S)$ sont la température de transition vitreuse de l'eau et du soluté respectivement; T_g' et $T_g(P)$ sont la température de transition vitreuse de la solution cryoconcentrée et du produit lyophilisé respectivement; T_e est la température eutectique. Lorsque la température diminue, le soluté S ne cristallise pas à T_e étant donnée l'importante viscosité à concentration élevée et à faible température. La cryoconcentration se poursuit donc au-delà de T_e , et la formulation passe de liquide visqueux à solide vitreux à la T_g' . La température du solide diminue sous T_g' , puis l'eau est graduellement retirée sous vide, ce qui entraîne l'augmentation de la T_g du produit hydraté. La T_g finale est plus ou moins inférieure à $T_g(P)$ dépendamment du taux d'humidité résiduelle dans le produit à la fin du cycle de lyophilisation. Adapté de (Liu, J. S., 2006), avec la permission de Taylor & Francis.

2.3.1 Congélation

Lors de la congélation, une séparation de phase s'effectue entre l'eau qui cristallise et la solution contenant les excipients et les polyplexes, ce qui entraîne la concentration des espèces en solution et abaisse la température de cristallisation de l'eau (Baertschi, c2005). Si la solution cryoconcentrée est un mélange eutectique, elle atteint éventuellement une température minimale à laquelle elle cristallise (T_e). Certaines solutions ne cristallisent pas, mais forment plutôt un solide amorphe lorsque leur viscosité devient suffisamment élevée pour inhiber la croissance des cristaux de glace. La température à laquelle ce processus de vitrification se produit s'appelle la température de transition vitreuse de la solution cryoconcentrée (T_g') (Liesebach et al., 2003). Généralement, il est préférable que la température finale de congélation soit au moins 2°C inférieure à T_e ou T_g' , et qu'elle soit maintenue pour un minimum de 2 h afin d'assurer une solidification complète de la solution (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Tang & Pikal, 2004). Les phases amorphe et cristalline sont habituellement désirables dans un produit lyophilisé; la phase amorphe assure la lyoprotection du principe actif, soit les polyplexes, alors que la phase cristalline confère les propriétés mécaniques nécessaires à l'obtention d'un lyophilisat adéquat, c'est-à-dire non affaissé (Baertschi, c2005).

Trois types de cycles de congélation ont été caractérisés pour la lyophilisation : la congélation instantanée à l'azote liquide; le dépôt des solutions sur des étagères prérefroidies; et diverses rampes en température à partir de la température ambiante. Les études ont démontré que la congélation à l'azote liquide, même en présence de cryoprotectants, peut mener à la dégradation des nanoparticules étant données les fortes contraintes résiduelles dans la matrice amorphe résultante (Baertschi, c2005; Rey & May, c2004). Le prérefroidissement des étagères provoque quant à lui une distribution inégale de la température entre la base et la surface des échantillons, entraînant la formation de cristaux de glace de tailles variables, donc la production de lyophilisats ayant une morphologie hétérogène (Rey & May, c2004; Tang & Pikal, 2004). Le refroidissement graduel des solutions (0.5–2 °C/min) permet une répartition homogène de la température dans les échantillons, donc une cristallisation uniforme, améliorant le processus de dessiccation subséquent et la stabilisation à long terme des lyophilisats résultants (Rey & May, c2004).

Toutefois, les solutions refroidies graduellement atteignent régulièrement des températures 10 à 15 °C inférieures à leur point de fusion (congélation) avant de cristalliser, ce phénomène

s'appelle la surfusion (Baertschi, c2005; Tang & Pikal, 2004). Or, plus la température de nucléation (début de cristallisation) est basse, plus la cristallisation dans l'échantillon se produit rapidement, et plus les cristaux sont petits, ce qui ralentit la dessiccation primaire (Searles, J. A. et al., 2001). Une cristallisation trop rapide peut d'ailleurs mener à l'apparition d'une seconde T_g' ($T_g'2$) inférieure à la première, nécessitant une réduction de la température de dessiccation primaire, ce qui prolonge la durée du cycle de lyophilisation (voir la section 2.3.3) (Goff et al., 2003). Pour certains excipients, notamment le mannitol et la glycine, une cristallisation trop rapide due à une surfusion trop prononcée peut favoriser la formation de solides amorphes métastables, c'est-à-dire qui cristallisent si leur température augmente au-delà de leur T_g' . La congélation des solutions à un taux de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ est habituellement un compromis adéquat entre une congélation trop lente ou trop rapide (Tang & Pikal, 2004). Au besoin, la température peut être maintenue isotherme à $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant d'abaisser la température davantage, ce qui peut améliorer l'homogénéité de la cristallisation à l'intérieur des échantillons et entre les échantillons (Tang & Pikal, 2004).

2.3.2 Recuit

Un recuit est un cycle thermique de quelques heures qui consiste à élever la température d'une solution congelée $10\text{ à }20\text{ }^{\circ}\text{C}$ au-dessus de sa T_g' , tout en la maintenant sous sa température de fusion (T_e pour les eutectiques), avant de la refroidir de nouveau (Tang & Pikal, 2004). Le recuit permet d'augmenter temporairement la mobilité moléculaire des produits congelés, favorisant ainsi deux processus : 1) la croissance des cristaux de glace, donc la réduction de la proportion d'eau non cristallisée contenue dans les structures amorphes; 2) la cristallisation des solutés eutectiques ayant formé un solide amorphe métastable. La durée du recuit doit être suffisante pour permettre l'achèvement de ces divers processus.

Comme discuté ultérieurement (sections 2.3.3 et 2.3.4), la formation de cristaux de glace plus volumineux et le retrait de l'eau contenue dans la phase amorphe permettent d'accélérer la dessiccation primaire et secondaire respectivement, ce qui réduit la durée du processus de lyophilisation (Searles, James A. et al., 2001). De plus, la cristallisation des solides amorphes métastables accroît la stabilité du produit lyophilisé (Rey & May, c2004). En effet, un produit métastable qui cristallise pendant la dessiccation ou l'entreposage rejette de l'humidité dans le produit, abaissant sa T_g et favorisant sa dégradation physique et chimique. Ainsi, la durée du

recuit doit être suffisante pour assurer la cristallisation complète des solutés eutectiques (Abdelwahed, Degobert, et al., 2006b). La durée optimale du recuit dépend principalement de la quantité et des propriétés de l'agent de masse, soit le principal excipient de la formulation. Lorsque l'agent de masse représente plus de 80% du soluté, sa cristallisation est beaucoup plus rapide que s'il forme moins de 50% de la totalité du soluté (Tang & Pikal, 2004). Bien que les recuits à basse température engendrent une cristallinité plus élevée étant donnée la supersaturation du soluté, l'augmentation de la viscosité des solutions dans ces conditions ralentirait la cristallisation sous des valeurs applicables en pratique. Les conditions de recuit doivent ainsi être ajustées pour atteindre un compromis entre cristallinité et vitesse de cristallisation (Tang & Pikal, 2004).

2.3.3 Dessiccation Primaire

La pression dans la chambre du lyophilisateur (P_c) est ensuite réduite sous la tension de vapeur de la glace dans l'échantillon, et de la chaleur est transmise à l'échantillon par la tablette, ce qui favorise la sublimation de l'eau cristallisée et son élimination par le condenseur (Baertschi, 2005). P_c se situe généralement entre 50 et 200 mTorr (Tang & Pikal, 2004). En fait, bien qu'un différentiel de pression élevé accélère la sublimation de la glace, il est déconseillé d'utiliser une P_c inférieure à 50 mTorr afin d'éviter la contamination des échantillons suite à l'extraction involontaire de composantes volatiles des bouchons ou de l'huile de la pompe à vide. La limite supérieure de 200 mTorr dépendant quant à elle de la capacité du condenseur. À cette pression, la dessiccation primaire devrait être effectuée à une température égale ou supérieure à $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, accélérant la sublimation de la glace et risquant ainsi une surcharge du condenseur et une perte de contrôle de la pression dans l'appareil. Comme mentionné précédemment, l'ajout d'un recuit après la congélation peut aussi accélérer la dessiccation primaire des formulations. En effet, des cristaux de glace plus volumineux mènent à la formation d'une structure plus poreuse après la sublimation. Or, le front de sublimation migrant de la surface de l'échantillon vers la base, le transit de la vapeur d'eau à travers la couche sèche de l'échantillon s'en trouve facilitée. Cette propriété s'appelle d'ailleurs la résistance de la couche sèche du produit au transport de la vapeur d'eau, ou résistance au transfert de masse du lyophilisat (Rambhatla et al., 2005; Searles, James A. et al., 2001; Tang & Pikal, 2004).

Généralement, à pression (P_c) et température de la tablette (T_s) constantes, la température dans l'échantillon (T_p) augmente de 1 à 3 °C pendant la dessiccation primaire. De plus, la température à la base de l'échantillon est habituellement 0.5 à 2 °C supérieure à la température au front de sublimation (Tang & Pikal, 2004). Or, pendant la dessiccation primaire, la T_p des solides amorphes ne doit pas excéder leur température d'affaissement (T_c), soit la température à partir de laquelle l'intégrité de leur structure macroscopique est compromise (voir Figure 2.5, p. 24) (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Baertschi, c2005). La T_c est généralement 2°C supérieure à la T_g' (Tang & Pikal, 2004). Pour les solides cristallins, T_p ne doit pas excéder la température eutectique (T_e), sinon il y a risque de refonte du solide congelé (Tang & Pikal, 2004). Les formulations ayant une T_g' (et T_c) ou une T_e élevée ont donc généralement des cycles de lyophilisation plus courts, la durée de leur phase de dessiccation primaire étant réduite d'environ 13% pour chaque augmentation de 1 °C de la T_p pendant la sublimation (Pikal, M. J., 1990). Pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'affaissement du produit tout en minimisant le temps du procédé, il est recommandé d'effectuer la dessiccation primaire à une T_p 2 °C sous la T_c lorsque le cycle de lyophilisation excède 2 jours; 5 °C sous la T_c lorsqu'elle requiert moins de 10 h; et 3 °C sous la T_c pour les durées intermédiaires (Tang & Pikal, 2004). Déterminer la température optimale de la tablette (T_s) pour atteindre la T_p cible est l'étape la plus complexe du cycle de lyophilisation. En effet, T_p est typiquement 5 à 40 °C sous T_s , et varie selon P_c , T_s , le coefficient de transfert thermique du flacon, le cycle de congélation, le recuit, etc. (Tang & Pikal, 2004)

Il est important de souligner que, même si l'affaissement des lyophilisats n'affecte pas forcément la taille des polyplexes après leur réhydratation, il peut mener à des taux d'humidité résiduelle plus élevés dans les produits finaux, donc affecter leur stabilité à long terme. La surface spécifique des lyophilisats étant réduite en cas d'affaissement, les temps de dessiccation secondaire et de réhydratation de ces produits peuvent être prolongés. Finalement, des produits affaissés ne sont généralement pas commercialisables pour des raisons esthétiques (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Pikal, M. J. et al., 1990; Tang & Pikal, 2004).

2.3.4 Dessiccation Secondaire

L'eau n'ayant pas cristallisé lors de la phase de congélation des échantillons, donc n'ayant pas sublimé lors de la dessiccation primaire, est ensuite retirée par désorption en augmentant T_s , tout en maintenant P_c constante entre les deux phases de dessiccation. En effet, la désorption de l'eau

est indépendante de la pression lorsque celle-ci est inférieure à 200 mTorr, ce qui est le cas pendant la dessiccation primaire (Pikal, M. J. et al., 1990). Dépendamment des excipients et des cycles thermiques précédents (congélation, recuit et dessiccation primaire), l'eau devant être retirée par désorption représente généralement entre 5 à 20% des solides amorphes, alors qu'elle est négligeable pour les solutés cristallins (Baertschi, c2005; Pikal, M. J. et al., 1990; Tang & Pikal, 2004). L'eau étant un plastifiant, la T_g , donc la T_c , augmente avec la réduction du contenu en eau résiduelle. La température de dessiccation secondaire peut donc être augmentée graduellement pour maximiser le taux de désorption sans provoquer l'affaissement du solide (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Tang & Pikal, 2004). En effet, à température constante, le taux de désorption d'eau diminue rapidement et le niveau d'humidité résiduelle atteint un plateau après 3 à 6 h (Pikal, M. J. et al., 1990). Une rampe en température de 0.1 à 0.15 °C/min permet habituellement de maintenir la température des produits amorphes sous leur T_c , alors qu'une rampe de 0.3 à 0.4 °C/min est recommandée pour les produits cristallins (Rambhatla et al., 2005; Tang & Pikal, 2004). Une fois la température finale de dessiccation secondaire atteinte, typiquement entre 40 et 50 °C, une isotherme additionnelle de 3 à 6 h suffit à minimiser le niveau d'eau résiduelle dans les échantillons, favorisant ainsi leur stabilité à long terme. En effet, la dégradation observée dans les solides est souvent modeste ($\leq 5\%$) et se situe dans la phase d'initiation des réactions, la mobilité des molécules étant réduite (Baertschi, c2005). Pour limiter la mobilité moléculaire dans les produits lyophilisés, ils sont généralement entreposés à une température maximale se situant 50 °C sous leur T_g . Il est donc important, pour une formulation donnée, de maximiser la T_g en diminuant l'humidité résiduelle dans les lyophilisats, ce afin d'être en mesure de les entreposer à température ambiante sans observer de dégradation excessive (Liu, J. S., 2006).

2.4 Excipients pour la Lyophilisation

2.4.1 Lyoprotectants

Comme mentionné précédemment, la congélation et la dessiccation engendrent des stress chimiques et physiques qui provoquent régulièrement une agrégation irréversible et/ou une perte de fonctionnalité des polyplexes suite à la lyophilisation. En général, l'ajout de stabilisants, soit des cryoprotectants ou lyoprotectants, permet d'éviter ces effets indésirables (Abdelwahed,

Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). Les cryoprotectants sont des excipients ajoutés aux formulations pour protéger les complexes des stress de congélation, alors que les lyoprotectants les protègent des stress de séchage. Les deux principales hypothèses proposées pour expliquer les mécanismes d'action de ces excipients sont: 1) l'isolement particulaire (*particle isolation/ vitrification hypothesis*); 2) le remplacement de l'eau (*water replacement hypothesis*) (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). La première hypothèse suppose que les polyplexes seraient séparés les uns des autres dans la matrice amorphe solide de cryoprotectant formée au moment de la congélation sous la T_g' . Leurs mouvements étant grandement limités, l'agrégation des polyplexes serait inhibée. Or, l'absence d'agrégation ne permet pas forcément de préserver la fonctionnalité des complexes (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). La seconde hypothèse, le remplacement de l'eau, suppose que, lors de la congélation, les lyoprotectants formeraient des liaisons hydrogène avec les groupements polaires des polyplexes de façon comparable aux molécules d'eau, prenant leur place et préservant l'intégrité des particules. La forme amorphe favoriserait la proximité entre les polyplexes et les lyoprotectants, donc la formation des liaisons hydrogène (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006). Puisque les lyoprotectants ont généralement des propriétés cryoprotectantes, cette désignation sera favorisée pour identifier cette classe d'excipients. Afin d'accélérer le développement de nouvelles formulations, il est recommandé d'effectuer des études de gel-dégel avec divers lyoprotectants potentiels afin de sélectionner ceux étant les plus efficaces pour une formulation donnée (Hinrichs et al., 2006; Schwarz & Mehnert, 1997). Divers agents ont été utilisés à titre de lyoprotectants ou d'agents de masse, notamment les disaccharides (sucrose, tréhalose, lactose, etc.), les polyols (mannitol, glycérol, sorbitol, etc.), les acides aminés (histidine, glycine, alanine, etc.), ou les polymères (dextran, polyvinylpyrrolidone (PVP), polyéthylène glycol (PEG)). (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Liu, J. S., 2006; Schersch et al., 2009; Wang, 2000). Tout comme les agents de masse (section 2.4.4), les lyoprotectants représentent souvent une proportion importante des solutés dans les formulations, ainsi leurs propriétés thermiques, soit leur T_g' ou T_c et leur T_g (voir le Tableau 2.1, p. 25), doivent être considérées lors du processus de sélection afin d'optimiser les temps de lyophilisation et de maximiser la stabilité des compositions finales pendant l'entreposage. Le tréhalose a d'ailleurs été caractérisé par plusieurs et s'est avéré un excellent lyoprotectant dont la T_g est très élevée

(Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Anchordoquy, T. J. & Koe, 2000; Liu, J. S., 2006; Schersch et al., 2009).

Une étude a démontré que des complexes CS/ADN PEGylés pouvaient être lyophilisés dans 1% mannitol et être entreposés pendant 1 mois à -20 ou 4 °C sans perte d'activité biologique (Mao, H.-Q. et al., 2001). Cette même étude a aussi montré que des résultats similaires pouvaient être obtenus pour des polyplexes lyophilisés dans 40% sucrose, mais entreposés à -20 °C seulement. Les travaux de Tahara et al. ont quant à eux démontré que des polyplexes formés de poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) et d'ARNic ou d'ODN, puis recouverts de chitosane, pouvaient être lyophilisés, sans affecter leurs propriétés physicochimiques, en présence de mannitol à un ratio massique lyoprotectant/nanoparticules supérieur à 5/1. Andersen et al se sont intéressés au comportement des polyplexes CS/ARNic (N/P = 50) non modifiés lors de la lyophilisation en présence de sucrose (Andersen et al., 2008). Leurs résultats ont démontré que ces polyplexes maintenaient une efficacité de silençage de 68% après lyophilisation dans 10% sucrose, et que cette efficacité diminuait à 32% après 2 mois d'entreposage à température ambiante (25 °C). Des résultats obtenus avec des formulations de complexes polyéthylèneimine ramifié (BPEI)/ADN suggèrent que divers dextrans pourraient agir à titre de lyoprotectant pour des polyplexes cationiques (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005). Par rapport aux disaccharides, ces polysaccharides ont toutefois une osmolarité beaucoup plus faible, permettant ainsi de concentrer les formulations lyophilisées lors de leur réhydratation sans qu'elles deviennent hypertoniques.

2.4.2 Tampons

L'hydrolyse, l'un des deux modes de dégradation des composés pharmaceutiques les plus courants, est affectée par plusieurs facteurs : le pH, le type de tampon, la force ionique, la température, le solvant, et les autres excipients (lyoprotectants, surfactants, excipients, etc.) (Baertschi, c2005). Une étude de Romøren et al. a permis d'observer une dégradation des complexes CS/ADN lors de l'entreposage à pH 5.5 dans un tampon acétate (Romøren et al., 2004). Bien que leurs résultats suggèrent la présence de dégradation hydrolytique du chitosane formant les polyplexes, cette possibilité n'a pas été caractérisée davantage. L'hydrolyse acide du chitosane non complexé aux acides nucléiques a toutefois été étudiée de façon plus exhaustive. Selon Vårum et al., la vitesse d'hydrolyse du CS en solution augmente avec la concentration en HCl, la température et la baisse du DDA (Vårum et al., 2001). L'hydrolyse serait moins rapide en

présence d'acide acétique ou d'acide maléique, ces derniers favorisant des conformations plus compactes du CS (Vårum et al., 2001). En effet, les liaisons glycosidiques localisées au centre des structures seraient plus difficilement accessibles pour être hydrolysées (Chen et al., 2009). Malgré le faible taux d'humidité résiduelle dans les produits lyophilisés, des processus de dégradation hydrolytique y sont observés (Tang & Pikal, 2004). Comme observé pour le CS en solution, le chlorure de chitosane lyophilisé est hydrolysé plus rapidement lorsque le DDA diminue et/ou que la température augmente (Holme et al., 2001). La dégradation demeure toutefois limitée après 60 jours à 60 °C, lorsque le DDA est de 98%. L'hydrolyse est davantage influencée par le pH de la solution avant lyophilisation, la vitesse de dégradation étant 30 fois plus élevée lorsque le pH de la formulation initiale diminue de 6 à 4.1. Cela pourrait être dû à la baisse graduelle du pH dans la phase cryoconcentrée pendant la congélation (Tang & Pikal, 2004).

Des tampons peuvent être utilisés pour contrôler le pH en solution, mais ils doivent être sélectionnés avec soin, car certains, tels les sels de phosphate, de succinate ou de tartrate, cristallisent ou précipitent lors de la congélation, causant des chutes de pH pouvant atteindre 4 unités de pH selon leur concentration et pH initiaux (Bhatnagar et al., 2007; Gómez et al., 2001; Shalaev et al., 2002; Sundaramurthi et al., 2010; Tang & Pikal, 2004). Ces sauts de pH peuvent parfois être évités en réduisant la concentration des tampons à quelques mM ou en ajoutant certains excipients qui ralentissent la cristallisation du tampon dans les formulations (Tang & Pikal, 2004). C'est d'ailleurs le cas de la glycine, qui, à faible concentration (≤ 50 mM), prévient la cristallisation du phosphate de sodium (Pikal-Cleland et al., 2002). Le citrate de sodium et le maléate de sodium, deux tampons qui ne cristallisent pas, sont préférables pour la lyophilisation, bien que le citrate soit plus intéressant étant donné sa T_g' plus élevée à divers pH (Shalaev et al., 2002) et son pK_{a3} (6.396, versus $pK_{a2} = 5.1$ pour le maléate), qui est plus près du pK_{ap} du chitosane (Alkhamis, 2009). En effet, les formulations injectables doivent idéalement avoir un pH neutre, toutefois les formulations de polyplexes à base de chitosane doivent être légèrement acides afin d'éviter la précipitation, le chitosane ayant un $pK_{ap} = 6.5$ (Richard et al., 2013). L-histidine, qui serait associé à une douleur moindre lors des injections comparativement au citrate (Laursen et al., 2006), serait un autre tampon intéressant. En effet, il possède pK_{a2} égal à 6.1, il affiche une cristallisation négligeable entre les pH 5.5 et 6.5, sa T_g' (-33°C) est supérieure au citrate de sodium (-41°C), et sa force ionique est plus faible à un pH quasi neutre pour une

molarité donnée (Kasper et al., 2011; Liu, J. S., 2006; Österberg & Wadsten, 1999). Il a d'ailleurs prouvé son efficacité pour la lyophilisation de polyplexes cationiques polyéthylèneimine (PEI)/ADN (Kasper et al., 2011), lesquels partagent certaines similarités avec les complexes à base de chitosane.

2.4.3 Antioxydants

L'oxydation est le second mode de dégradation des composés pharmaceutiques les plus courants. Chang et al. ont observé que, bien que l'hydrolyse et l'oxydation du CS en solution se produisent simultanément, l'ajout de H₂O₂ en faible concentration en influence davantage la dégradation (Chang, K. L. B. et al., 2001). Toutefois, comme mentionnée précédemment, la dégradation est souvent réduite dans la phase solide (Baertschi, c2005). En fait, le niveau des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les lyophilisats augmente avec la température d'entreposage et la baisse de leur T_g, donc l'augmentation de leur mobilité moléculaire (Molina, Marion d C. et al., 2004). Malgré tout, une étude accélérée réalisée par Holme et al. a démontré que l'oxydation de chlorures de CS (86% DDA) lyophilisés serait négligeable en comparant leurs profils de dégradation à 105°C en présence ou en absence d'oxygène gazeux (Holme et al., 2001). Limiter la présence d'oxygène et de traces de métaux dans les formulations serait les deux approches à privilégier pour limiter l'oxydation des produits (Baertschi, c2005). Il est possible d'ajouter des agents antioxydants ou des capteurs de radicaux libres dans les formulations. Or, une étude antérieure effectuée sur des solutions de CS a démontré que seuls le thiourée ou le pyruvate de potassium (Tanioka et al., 1996), qui ne figurent pas dans la liste d'excipients approuvés par la FDA (FDA, 2010), prévenaient la dépolymérisation oxydative du CS.

2.4.4 Agents de Masse et Tonifiants

Les agents de masse sont généralement ajoutés aux formulations afin d'ajuster leur tonicité, d'augmenter la masse ou le volume du produit lyophilisé, d'en prévenir l'affaissement, donc d'en améliorer l'apparence et les temps de réhydratation. En fait, bien qu'un lyophilisat affaissé ne soit pas acceptable d'un point de vue pharmaceutique, les effets négatifs de l'affaissement sur les formulations (taille des complexes, stabilité, taux d'humidité résiduelle, temps de réhydratation, etc.) demeurent variables selon les composés étudiés (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Meyer et al., 2009; Rey & May, c2004; Schersch et al., 2009). La glycine est un agent de

masse qui, conjugué au sucrose, adopte davantage la forme amorphe que cristalline, ce qui expliquerait la meilleure stabilité de certaines formulations d'anticorps suite à leur lyophilisation avec ces excipients (Meyer et al., 2009). Le mannitol, ajouté au sucrose en ratio massique mannitol:sucrose suffisant, soit 4:1, permet quant à lui de prévenir l'affaissement du solide, bien que la stabilité du principe actif ne soit pas forcément assurée pendant la lyophilisation (Meyer et al., 2009; Schersch et al., 2009). Malgré l'amélioration potentielle des propriétés du lyophilisat suite à l'ajout de mannitol, son usage requiert des ajustements au cycle de lyophilisation. En effet, si la congélation est trop rapide, le mannitol peut former un solide amorphe métastable qui prend de l'expansion en cristallisant pendant la dessiccation, ce qui peut entraîner la rupture des flacons s'ils sont remplis à plus de 30% de leur capacité (Abdelwahed, Degobert, et al., 2006a; Baertschi, c2005). L'ajout d'un recuit peut éviter cette problématique. Des lyophilisats affichant divers degrés d'affaissement sont présentés à la Figure 2.5.



Figure 2.5 Lyophilisats comprenant divers ratios mannitol:sucrose [1) 4:1, 2) 3.5:1.5, 3) 3:2, 4) 1:1, 5) 2:3, 6) 1.5:3.5, 7) 1:4]. Différents degrés d'affaissement ont été observés pour ces formulations [Aucun : 1, Moyen : 2-5, Sévère : 6-7]. Adapté de (Schersch et al., 2009). Copyright 2016, avec la permission d'Elsevier.

Les agents de masse formant la majorité de la masse du soluté des formulations, ceux ayant une T_g (T_c) ou T_e élevée permettent habituellement d'accélérer le processus de lyophilisation, la dessiccation primaire pouvant être effectuée à température plus élevée. L'effet de chaque agent de masse sur les propriétés thermiques de la composition doit toutefois être caractérisé et les étapes du cycle de lyophilisation doivent être optimisées en conséquence. En effet, bien que le

mannitol ait une $T_c = -1^\circ\text{C}$ (Liu, J. S., 2006), il peut former des hydrates sous forme amorphe en présence de sucrose, abaissant ainsi la T_g' de la solution finale au lieu de l'augmenter (Hawe & Frieß, 2006). Outre leur impact sur la lyophilisation, les agents de masse peuvent aussi influencer la stabilité des lyophilisats pendant l'entreposage. En effet, comme discuté précédemment, ceux ayant une T_g élevée peuvent favoriser la stabilité du produit final, le tréhalose et le PVP étant de bons exemples (voir Tableau 2.1).

Les agents de masse, au même titre que les lyoprotectants, sont aussi utilisés pour ajuster la tonicité des formulations afin de limiter les dommages infligés aux tissus, donc l'inflammation, lors de leur administration *in vivo* (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Shire, 2009). Les sels doivent être évités pour ajuster la tonicité des formulations de polyplexes cationiques lyophilisées, car : ils écrantent les charges sur le CS (Rowe et al., 2009); ils diminuent la T_g' des produits avant la dessiccation (Hawe & Frieß, 2006); ils diminuent le taux de cristallisation et la T_g des produits finaux; et ils augmentent leur taux d'humidité résiduelle (Santagapita & Buera, 2008). Pour une même concentration massique, les dextrans, qui ont un poids moléculaire élevé, permettent de diminuer l'osmolarité des solutions (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005), alors que les petites molécules, comme la glycine, permettent d'en augmenter l'osmolarité.

Tableau 2.1 Transitions vitreuses et température d'affaissement d'excipients pour la lyophilisation.

Excipient		T_g' ($^\circ\text{C}$)	T_c ($^\circ\text{C}$)	T_g ($^\circ\text{C}$)
Catégorie	Composé			
Disaccharides	Sucrose	-32	-31	75
	Tréhalose	-29	-28.5	118
	Lactose	-28	-30.5	114
Polyols	Glycérol	-65	—	-93
	Mannitol	-35, -1.0*	-1.4	13
Acides aminés	Glycine	-62, -3.5*	—	30
	Histidine	-33	—	37
Polymères	Dextran (40 kDa)	—	—	101
	PVP (40 kDa)	-20.5	-24	180
Tampon	Citrate de sodium	-41	—	—
	Tris · HCl	-65, -13*	—	—

Adapté de (Liu, J. S., 2006), * Température eutectique.

2.4.5 Flacons et Bouchons

Le type de flacon utilisé pour la lyophilisation influence l'efficacité du processus et la stabilité à long terme des lyophilisats. En effet, les flacons de verre usinés par extrusion (*tubing*) offrent un meilleur transfert de chaleur par conductivité que les flacons de verre moulé, et le verre de Type I est moins réactif que les autres types de verre disponibles (Pikal, Michael J., 1985; Rey & May, c2004). Une récente étude a aussi démontré que l'utilisation de flacons hydrophobisés, qui limitent l'adhésion des lyophilisats aux parois de verre, permettait de réduire la quantité de fissures observées dans les lyophilisats, possiblement dus à une réduction des contraintes dans le produit pendant la dessiccation (Ullrich et al., 2015a). La réduction de la mouillabilité du verre menait d'ailleurs à la formation de lyophilisats ayant une surface plane.

L'humidité contenue dans les bouchons, de même que leur taux d'absorption et de désorption d'humidité, influence aussi la stabilité à long terme des produits. En effet, un équilibre se crée entre l'humidité relative contenue dans les bouchons et les lyophilisats pendant l'entreposage. Ce phénomène est amplifié pour les produits biologiques, dont les masses finales lyophilisées sont généralement moindres (Rey & May, c2004). Les bouchons synthétiques en bromobutyle, qui ont un faible taux d'humidité résiduelle et un faible taux d'absorption, semblent préférables pour limiter l'humidification des lyophilisats pendant l'entreposage (Corveleyn et al., 1997; Rey & May, c2004). Le remplissage de l'espace de tête des flacons avec un gaz inerte semblerait aussi limiter l'augmentation de l'humidité résiduelle dans les lyophilisats (Corveleyn et al., 1997).

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

Les chapitres 4 à 6, qui représentent le corps de la thèse, couvriront les travaux de recherche effectués afin d'atteindre les objectifs de la thèse (voir section 1.1). Les résultats et leur interprétation sont présentés sous la forme d'un article publié, un article soumis, et un chapitre rédigé suivant le même format que les deux articles précédents. Le document se conclut par une discussion générale, suivie d'une conclusion et de recommandations sur les travaux futurs pouvant donner suite à la thèse.

Le chapitre 4 présente l'étude traitant du développement de formulations lyophilisées de CS/ADN pouvant être réhydratées à des concentrations d'ordre clinique pour la livraison de gène. Les formulations ont été optimisées à l'aide de complexes formés avec le plasmide EGFP_{Luc}, lequel code pour deux gènes rapporteurs qui simplifient grandement l'analyse de la transfection *in vitro*: la protéine fluorescente verte améliorée (EGFP) et la luciférase (Luc). Des études de gel-dégel ont permis d'identifier, par diffusion dynamique de la lumière (DLS), des lyoprotectants potentiels et leurs concentrations effectives pour préserver la taille et la distribution des tailles des polyplexes (PDI). Des études de lyophilisation ont ensuite permis d'identifier la concentration minimale de tampon devant être ajoutée aux formulations afin d'éviter l'agrégation des polyplexes après réhydratation. Ces formulations optimisées ont ensuite été réhydratées à des concentrations plus élevées et la morphologie des complexes obtenus a été observée par microscopie électronique à balayage (SEM). L'efficacité de transfection de ces formulations a été mesurée par cytométrie en flux, en quantifiant le pourcentage de cellules HEK293 exprimant EGFP, et par luminométrie, en mesurant la quantité de luciférase exprimée par ces cellules. Finalement, la biocompatibilité de ces formulations a été évaluée *in vitro*. Cette étude a été publiée : D. Veilleux, M. Nelea, K. Biniecki, M. Lavertu, and M. D. Buschmann, "Preparation of Concentrated Chitosan/DNA Nanoparticle Formulations by Lyophilization for Gene Delivery at Clinically Relevant Dosages," *J Pharm Sci*, vol. 105, pp. 88-96, 2016.

Le chapitre 5 présente les travaux réalisés pour lyophiliser et concentrer les polyplexes CS/ARNic, incluant l'évaluation des impacts sur les formulations de la séquence des oligonucléotides, de la composition des tampons, et du recouvrement des polyplexes avec de l'acide hyaluronique. La taille, le PDI, et la charge (potentiel zêta) de polyplexes CS/ODN,

préparés à $N/P = 2$ ou 5 dans divers tampons, à des forces ioniques croissantes, ont été analysés. La relation entre la taille des polyplexes, leur concentration, et leur contenu en chitosane libre a été établie pour certaines formulations par analyse de suivi individuel de particules (NTA) et par centrifugation des complexes et analyse colorimétrique de leur surnageant. Les concentrations minimales de tampon requises pour préserver les propriétés physicochimiques des diverses formulations de polyplexes pendant la lyophilisation ont été identifiées. Ces formulations optimales ont ensuite été utilisées pour évaluer l'effet des séquences des oligonucléotides sur la stabilité des polyplexes pendant la lyophilisation. L'efficacité du chitosane à condenser les divers oligonucléotides a été évaluée par un procédé d'exclusion d'un colorant fluorescent spécifique pour les acides nucléiques. La quantité minimale de chitosane requise pour former des polyplexes cationiques, de même que le point isoélectrique de ces polyplexes, ont ensuite été mesurés par titrage des oligonucléotides avec du chitosane. L'efficacité de silençage et la cytotoxicité des polyplexes CS/ARNic lyophilisés et réhydratés ont été mesurées *in vitro* sur des cellules eGFP⁺ H1299. L'hémocompatibilité de ces formulations a été évaluée et leur morphologie a été observée par microscopie électronique à transmission (TEM). Ces résultats ont été soumis pour publication dans la revue *Biomacromolecules* : D. Veilleux, A. Chevrier, R. K. G. Panicker, K. Biniecki, M. Lavertu, and M. D. Buschmann, "Lyophilization and Concentration of Chitosan/siRNA Polyplexes : Effects of Oligonucleotide Sequence, Buffer Composition, and Coating with Hyaluronic Acid".

Le chapitre 6 présente l'optimisation des cycles de lyophilisation pour les formulations optimisées dans les chapitres précédents. La température de transition vitreuse de la solution cryoconcentrée (T_g') a été mesurée par calorimétrie différentielle à balayage modulé (mDSC) pour diverses formulations et leurs excipients. Les valeurs expérimentales mesurées ont été utilisées pour confirmer la validité du modèle de Fox à prédire la T_g' des formulations de polyplexes. La microstructure des lyophilisats a été observée par SEM pour déterminer l'impact du contenu en excipient sur le microaffaissement. Les cycles de lyophilisation ont ensuite été optimisés pour diverses conditions de remplissage des flacons, selon diverses conditions de dessiccation préalablement modélisée. La validité des cycles de lyophilisation a été confirmée en analysant les profils de température des échantillons pendant les diverses étapes du processus et en photodocumentant la morphologie macroscopique finale des lyophilisats.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: PREPARATION OF CONCENTRATED CHITOSAN/DNA NANOPARTICULE FORMULATIONS BY LYOPHILIZATION FOR GENE DELIVERY AT CLINICALLY RELEVANT DOSAGES

Daniel Veilleux ¹, Monica Nelea ², Kristof Biniecki ³, Marc Lavertu ², and Michael D.
Buschmann ^{1,2,*}

¹ Institute of Biomedical Engineering, Polytechnique Montreal, Montreal, Quebec, Canada

² Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³ Department of Scientific Affairs, ANRis Pharmaceuticals Inc, Kirkland, Quebec, Canada

4.1 Abstract

Chitosan/DNA polyplexes have been optimized for efficient and safe in vitro and in vivo gene delivery. Clinical application of this technology requires the development of formulations with higher concentrations to reach therapeutic dosages. Polyplexes were prepared using chitosan and EGFP_{Luc} plasmids. Freeze-thawing and freeze-drying studies were performed to identify and optimize lyoprotectant and buffer contents in formulations. Freeze-dried samples were rehydrated in reduced volumes to increase their final DNA dose. Nanoparticle physicochemical properties were analyzed, and their transfection efficiency and cytotoxicity were measured in HEK 293 cells. Data showed that 3.5 mM histidine buffer (pH 6.5) combined with one of 0.5 % wt/vol sucrose, dextran 5 kDa, or trehalose, was required to prevent polyplex aggregation during freeze-drying. Optimal formulations could be concentrated 20-fold, to a clinically desired ~ 1 mg of DNA/mL, while maintaining near physiological pH and tonicity. Polyplexes were predominantly spherical, with diameters below 200 nm, polydispersity indexes below 0.32, and zeta potentials above +19 mV. Rehydrated formulations had transfection efficiencies no less than 65% of fresh polyplexes without excipients and had no effect on viability and metabolic activity of HEK 293 cells. These concentrated formulations represent an important step towards clinical use of chitosan-based gene delivery systems.

4.2 Keywords

Chitosan, DNA/oligonucleotide delivery, non-viral gene delivery, nanoparticles, freeze-drying/lyophilization, formulation, toxicity.

4.3 Introduction

Significant efforts have been made in recent years to develop safe, efficient non-viral polymeric gene delivery vectors for clinical applications. Chitosan (CS), a natural cationic polysaccharide, self-assembles with nucleic acids to form polyelectrolyte complexes with high in vitro and in vivo transfection efficiencies (Alameh et al., 2012; Buschmann et al., 2013; Jean, Myriam et al., 2012; Jean, M. et al., 2009; Lavertu, Marc et al., 2006). Our previously published subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) studies, and more recent unpublished intravenous (IV) studies with small interfering RNA (siRNA), have shown biodistribution to organs other than the liver (Jean, M. et al., 2011; Jean, M. et al., 2009). These systems require additional optimization including lyophilization and concentration to increase dose prior to clinical use. As with most self-assembling systems, CS/DNA nanoparticles require preparation in dilute conditions ($\sim 100 \mu\text{g}$ of DNA/mL) to produce small uniformly sized nanoparticles, limiting concentrations and therapeutic applications (MacLaughlin et al., 1998; Xu & Anchordoquy, 2011). These colloidal systems also have limited stability in solution over long-term storage as they are prone to physical instability (aggregation) and chemical degradation (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001; Romøren et al., 2004). Mixing and preparation of polyelectrolyte complexes just prior to use is not only impractical, but may lead to significant variations in product quality and efficiency, and severely limit quality control testing prior to administration (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001; Kasper et al., 2011).

Lyophilization, or freeze-drying, a low temperature dehydration process widely used in the pharmaceutical industry, can be used to concentrate therapeutic agents by rehydrating them in reduced volumes prior to injection. The process is however associated with freezing and drying stresses. Freezing is associated with a phase separation between water that crystallizes and the remaining liquid solution, resulting in a cryoconcentrated state favorable to mechanical and chemical degradation of nanoparticles (Kasper et al., 2011). Lyoprotectants are generally added to nanoparticle suspensions to prevent their irreversible aggregation and loss of functionality

during lyophilization. They would form an amorphous matrix in the cryoconcentrated phase, shielding nanoparticles from one another (the particle isolation hypothesis) while further stabilizing them through hydrogen bonding with their polar groups upon water removal (water replacement hypothesis) (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). Disaccharides, oligosaccharides, polysaccharides, and polymers have all been used as lyoprotectants to stabilize compositions during freeze-drying (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006; Anchordoquy, T. J. & Koe, 2000; Kwok et al., 2000; Liu, J. S., 2006; Schersch et al., 2009; Wang, 2000). Freeze-thaw studies are an efficient approach to rapidly screen for potential lyoprotectants while optimizing formulations for lyophilization (Hinrichs et al., 2006; Schwarz & Mehnert, 1997). Buffers may also be used to stabilize pH in the cryoconcentrated phase, preventing nanoparticle acid hydrolysis or modification of their surface charge (Tang & Pikal, 2004). Ideal buffers should have near-neutral pK_a values for clinical use, yet be slightly acidic to prevent CS/DNA polyplex aggregation upon rehydration and maintain their transfection efficiency (Nimesh et al., 2010; Richard et al., 2013). Phosphate, succinate or tartrate salts must however be avoided, as they are prone to crystallization or precipitation at low temperatures, causing pH shifts of up to 4 units during lyophilization (Bhatnagar et al., 2007; Gómez et al., 2001; Shalaev et al., 2002; Sundaramurthi et al., 2010; Tang & Pikal, 2004). L-histidine (His) has interesting properties for lyophilization, with a pK_{a2} of 6.1 and negligible crystallization upon freeze-drying at pH between 5.5 and 6.5 (Österberg & Wadsten, 1999).

Attainable concentration factors are generally limited by the amounts of excipients required to preserve nanoparticle integrity during lyophilization and the need for near-isotonicity in the reconstituted formulations (e.g. 10% sucrose) (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). Previously, investigation of lyophilization of CS/siRNA polyplexes by Andersen et al. suggested that 5 to 10% sucrose was necessary to preserve both particle size and biological activity after rehydration (Andersen et al., 2008), limiting their concentration to a factor of 2 at most while maintaining tonicity. Similar results were observed with polyelectrolyte complexes made with other cationic polymers, such as poly(D,L lactic-co-glycolic acid) (Cun et al., 2010; Katas et al., 2009), poly(L-lysine) (PLL) (Miyata et al., 2005), quaternized gelatin (Zillies et al., 2008), or polyethyleneimine (PEI) (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005; Brus et al., 2004; Hinrichs et al., 2006; Kasper et al., 2011; Molina, Marion d.C. et al., 2001; Pfeifer et al., 2011).

The aim of this study was to develop biocompatible, near-neutral (pH), CS/DNA polyplex compositions that could be lyophilized and rehydrated to concentrate DNA, while preserving nanoparticle physicochemical properties and biological activity, and retaining isotonicity. Therefore, preliminary freeze-thaw and freeze-drying studies were sequentially performed to respectively identify minimal concentrations of lyoprotectants, including mannitol, sucrose, dextran 5 kDa or trehalose, along with His buffer required to prevent CS/DNA polyplex aggregation following lyophilization. Optimized compositions were freeze-dried and rehydrated to higher concentrations, and polyplex hydrodynamic radius, polydispersity, zeta potential, morphology and transfection efficiency were assessed. The influence of CS and lyophilized CS/DNA polyplexes on viability and metabolic activity of human embryonic kidney 293 (HEK 293) was measured and compared to the gold standard among non-viral gene delivery vectors, BPEI and BPEI/DNA polyplexes, which are known for their toxicity in vitro (Moghimi et al., 2005). Although lyophilization is also used to increase shelf life of therapeutic agents, the long-term storage stability of these formulations will be assessed in future studies.

4.4 Material and Methods

4.4.1 Materials

CS was from Marinard. Deuterium oxide (Cat #151882), deuterium chloride 35%wt in deuterium oxide (Cat # 543047), sodium hydroxide (Cat #S5881), sodium nitrite (Cat #431605), 1N hydrochloric acid solution (Cat #318949), glacial acetic acid (Cat #338826), sodium azide (Cat #S2002), sodium acetate trihydrate (Cat #S7670), 1N sodium hydroxide solution (Cat #319511), mannitol (Cat #M1902), sucrose (Cat #S0389), trehalose dihydrate (Cat #T0167), L-histidine (Cat #H6034), sodium chloride (Cat #S6191), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) hydrate (Cat #M2933), sodium bicarbonate (Cat #S5761), and triton X-100 (Cat #T8532), Branched polyethylenimine (BPEI, $M_w = 25$ kDa, Cat #408727) were from Sigma-Aldrich. Dextran 5 kDa (Cat #5510 0005 8006) was from Pharmacosmos. Serum vials (Cat #223683), and aluminum seals (Cat #22418201) were from VWR. Butyl stoppers (Cat #73828-13) were from Kimble Chase. Optitran BA-S 83 membrane (Cat #10439394) was from Whatmann. HEK 293 cells were from ATCC (ATCC #CRL 1573). Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM HG, Cat #12800-017), Fetal Bovine Serum (FBS, Cat #26140), Lipofectamine (Cat

#11668-019), Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Cat #25200-056), DH5 α competent cells (Cat #18263-012), and AlamarBlue Cell Viability Reagent (Cat #DAL1025) were from LifeTechnologies. Bright-Glo Luciferase Assay System (Cat #E2620) and Glo Lysis Buffer (Cat #E2661) were from Promega. BCA Protein Assay Kit (Cat #23227) was from Pierce Biotechnology. Plasmid EGFP Luc (Cat #6169-1) and LDH Cytotoxicity Detection Kit (Cat #630117) were from Clontech Laboratories. The EndoFree Plasmid Mega Kit (Cat #12391) was from Qiagen. Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Cat #11873580001) was from Roche Life Science.

4.4.2 Preparation of CS/DNA Nanoparticle Formulations

Commercial CS was heterogeneously deacetylated using concentrated sodium hydroxide and was depolymerized using nitrous acid, as previously described (Lavertu, Marc et al., 2006). A degree of deacetylation (DDA) of 92 to 93.7% was measured by ^1H NMR, according to Lavertu et al. (Lavertu, M et al., 2003), and a number-average molecular mass (M_n) of 7.5 to 11.3 kDa (PDI of 1.23 to 1.52) was determined by gel permeation chromatography (GPC)-multi-angle light scattering (MALS), as described in Nguyen et al. (Nguyen et al., 2009). Dry CS was dissolved in 28 mM HCl overnight at RT to a final stock solution concentration of 5 mg/mL. The stock solution was sterile filtered, then diluted to 271 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with Milli-Q water; and/or sterile mannitol, sucrose, dextran, or trehalose; and/or histidine (pH 6.5). The plasmid EGFP Luc stock solution was prepared and characterized by UV spectrophotometry, as described in Lavertu et al. (Lavertu, Marc et al., 2006) The plasmid DNA solution was diluted to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with Milli-Q water and/or excipients, as described for CS. All polyplexes were formed at chitosan amine to DNA phosphate ratio of 5 ($N/P = 5$), by mixing equal volumes of CS and DNA, pipetting CS up and down approximately 10 times immediately following addition to DNA. Samples were left to stabilize at RT for 30 minutes prior to use.

4.4.3 Freeze-Thawing, Freeze-Drying and Rehydration of Nanoparticle Suspensions

A total of 400 μL samples were transferred to cryovials and then were frozen to -80°C overnight, using a Nalgene Mr. Frosty freezing container to maintain a cooling rate of $-1^\circ\text{C}/\text{min}$. Samples were thawed 30 minutes at RT prior to use. Sample volumes of 400 μL or 2 mL were freeze-dried

in 2 or 10 mL serum vials respectively, with 13 or 20 mm butyl lyophilization stoppers. Sample trays were covered with a Whatmann Optitran BA-S 83 membrane to prevent dust or bacterial contamination. Freeze-drying (FD) was carried in a Laboratory Series Freeze-Dryer PC/PLC (Millrock Technology, Kingston, NY, USA), using the following cycle: ramped freezing from RT to -40°C in 1 hour, then maintaining isothermal at -40°C for 2 hours; primary drying for 48 hours at -40°C , at 100 mTorr; and secondary drying at 100 mTorr, increasing temperature to 30°C at a rate of $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and then maintaining isothermal at 30°C for 6 hours. Samples were backfilled with argon, stoppered, crimped, and stored at 4°C until reconstitution, 30 minutes prior to use. The FD temperature was fixed at -40°C based on glass transition temperatures of maximally cryoconcentrated solutions (T_g') of lyoprotectants (sucrose, dextran, and trehalose), histidine (pH 6.5), and different lyoprotectant-histidine mixtures, supplied or not with CS or CS/DNA polyplexes. T_g' were measured using modulated dynamic scanning calorimetry (mDSC). Since presence of CS or polyplexes had negligible effect on T_g' at working concentrations, the Fox equation for multi-component systems could be used to predict formulations T_g' using excipient contents only (Shah & Schall, 2006). All formulations had T_g' equal or greater than -33°C , depending on the lyoprotectant used (data not shown).

All FD cakes were white and showed no collapse, although minimal retraction was seen along the edges of the vials. Samples were reconstituted to their initial concentration (Rh1X) using 400 μL or 2 mL Milli-Q water, or to 20 times their initial concentration (Rh20X) using 20 μL or 100 μL Milli-Q water. All formulations rehydrated instantaneously at Rh1X, and rehydrated in less than a minute at Rh20X. For Rh20X samples, samples were diluted back to 1X with Milli-Q water just prior to use, 30 minutes post reconstitution. For toxicity studies, parts of the Rh20X samples were diluted back to 10X (Dil.10X), instead of 1X (Dil.1X). Preliminary DLS analyses revealed the dilution of Rh20X samples back to their initial concentration prior to analysis had no impact on nanoparticle properties (data not shown). This method was therefore implemented to circumvent possible complications associated with analysis of concentrated formulations, namely interactions between polyplexes and increased viscosities due to higher excipient, free CS, and nanoparticle content.

4.4.4 Formulation pH and Osmolality

100 μ L samples (n=3) were used to assess formulation pH using a Accumet Model 20 pH meter and a Ross glass combination micro electrode (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 250 μ L samples (n=3) were used to measure osmolalities using a Advanced Model 3250 Single-Sample Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA, USA). Rh20X samples were not diluted to 1X for these analyses, but multiple samples were combined when necessary.

4.4.5 Nanoparticle Size and Surface Charge Analysis

Particle hydrodynamic diameter (Z-average and intensity mean diameter) and polydispersity index (PDI) were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), using disposable microcuvettes. Each sample was analyzed two consecutive times at 25°C, where each analysis consisted of 12 to 20 successive readings (10 seconds photon counts/reading) averaged, as optimized by the instrument. Particle zeta potential (ZP) was measured by Laser Doppler Velocimetry (LDV) with the Zetasizer Nano ZS, using disposable capillary cells. Each sample was diluted to a volume of 800 μ L and a final NaCl concentration of 10mM, and was analyzed three consecutive times at 25°C. Nanoparticles zeta potentials were calculated from their electrophoretic mobilities using the Smoluchowski equation (Kaszuba et al., 2010). Diluent viscosity and refractive index (RI) were adjusted according to excipient content.

4.4.6 Nanoparticle Scanning Electron Microscopy Imaging

Small volumes of sample were pulverized on polished silicon wafers using a gas spray method, and then were sputter-coated with gold. Observations were performed using the high vacuum mode of a Quanta FEG 200 environmental SEM (FEI, Hillsboro, OR, USA): accelerating voltage of 20 kV; spot size of 3; working distance of ~5 mm. Six to ten images were taken per sample, measuring the length of 18 to 45 particles on each image.

4.4.7 *In vitro* Transfection

Previous work showed that CS/DNA (N/P = 5) polyplexes have optimal transfection efficiency in HEK 293 cells in slightly acidic medium (pH 6.5), in presence of 10% FBS (Nimesh et al., 2010). Under these conditions, polyplexes are positively charged, given their pK_{ap} of ~ 7 (Richard et al.,

2013), allowing for high cell uptake. Consequently, HEK 293 cells were cultured in DMEM HG supplemented with 1.85 g/L of sodium bicarbonate and 10% FBS, at 37°C in 5% CO₂. Cells were maintained and sub-cultured according to ATCC recommendations, without any antibiotics. 24-well culture plates were seeded with 70,000 cells in 500 µl of culture medium, and incubated 24h to reach ~50% confluency for transfection. DMEM HG with 5 mM MES, 10mM sodium bicarbonate, and 10% FBS, subsequently referred to as transfection medium, was equilibrated overnight at 37°C, 5% CO₂ and pH was adjusted to 6.5 with 1 N sterile HCl prior to transfection. Culture medium was removed from cells and replaced with 450 µL of transfection medium and 50 µL of CS/DNA formulation, for a final DNA concentration of 2.5 µg/well. Cells were incubated 24h with polyplexes at 37°C, in 5% CO₂, then medium was removed and cells were replenished with 500 µL of culture medium. After an additional 24h incubation period, cells were observed under a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert TV 100, GmbH Germany) to monitor any morphological changes, and percentage of transfection and transgene expression levels were assessed by flow cytometry and luminometry respectively. Lipofectamine was used as positive control, as described in Lavertu et al. (Lavertu, Marc et al., 2006), and naked DNA was used as a negative control.

4.4.8 Flow Cytometric Determination of Percentage of Transfection

Cells were trypsinized (trypsin 0.25%-EDTA) and transferred to 5 mL flow cytometry tubes. For each sample, enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression was measured for 20,000 events using a MoFlo XDP cytometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) equipped with a 488nm argon laser for excitation (model ENTCII-621, Coherent, Santa Clara, CA, USA) and a 510/20nm (FL1) band pass filter, with photomultiplier tube voltages of 500, to detect fluorescence. Forward (FSC) and side (SSC) scatter were used to establish a collection gate to exclude dead cells and debris. The Summit software (V4.3.02, Build 2451) was used to determine the EGFP positive events by a standard gating technique: a control sample (cells only) was displayed on a FL1 Log versus Counts graph, and the gate drawn such that control cells were excluded. The percentage of positive events was the number of events within the gate, divided by the total number of events.

4.4.9 Luminometric Determination of Luciferase Expression

Transfected cells were washed with 100 μ L phosphate buffered saline (PBS), then lysed with 100 μ L of Glo Lysis Buffer. Cell lysate aliquots of 25 μ L were transferred to 96-well white luminescence plates and were supplemented with an equal amount of Bright-Glo substrate prior to measurement on an Infinite M200 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland). Cell lysate aliquots of 25 μ L were used to determine the protein content using BCA Protein Assay kit. The luminescence relative light units (RLU) were normalized to the protein content of each sample.

4.4.10 Cytotoxicity Assays

Cells were transfected as previously described, but with the following modifications: 10,000 cells/well were seeded in 96-well flat bottom culture plate 24h prior to transfection, then culture medium was replaced with 90 μ L of equilibrated transfection medium and 10 μ L of sample. BPEI/DNA polyplexes (N/P = 5) and free BPEI were used as toxic controls, and were prepared as described in Richard et al. (Richard et al., 2013). Excipients only, untreated cells, and blanks were used as controls to normalize the cytotoxicity levels measured. Cytotoxicity was assessed 24h post transfection.

Cell viability, or integrity of the cell membrane, was determined with the lactate dehydrogenase (LDH) assay. 100 μ L of pre-warmed PBS was added to wells, samples were centrifuged 10 min at 250 g, and 80 μ L of supernatants (conditioned media) were transferred to a 96-well plate. The remaining supernatant was discarded and cell pellets were resuspended in 100 μ L of 1% Triton-X 100 in 1X Complete Protease Inhibitors and 100 μ L of transfection medium. After incubation for 30 min at 37°C, samples were centrifuged 10 min at 250 g, and 80 μ L of supernatants (cell lysates) were transferred to a 96-well plate. Conditioned media and cell lysates were supplemented with 100 μ L of LDH reaction mixture and were incubated 30 min at RT on the orbital shaker. Absorbance was then measured at 492 nm, and was subtracted with absorbance measured at the reference wavelength of 690 nm. Viability is expressed as follows:

$$\text{Viability (\%)} = 100 - \text{Abs}_{\text{med}} / (\text{Abs}_{\text{med}} + \text{Abs}_{\text{lys}}) \quad (3.1)$$

where Abs_{med} is the absorbance of conditioned media and Abs_{lys} is the absorbance of cell lysates. Less than 10% LDH release, therefore viability above 90%, was regarded as non-toxic in our experiments (Fischer et al., 2003; Shcharbin et al., 2010).

Metabolic activity was assessed by adding 10 μ L of AlamarBlue reagent to each sample well and incubating an additional 4h. Then, 80 μ L of sample was transferred from each well to a 96-well plate, absorbance was measured at 570 nm, using 600 nm as reference wavelength, and data was analyzed using the general method described by the manufacturer.

4.4.11 Statistical Analysis

Unless otherwise indicated, data were expressed as mean value \pm standard deviation ($n = 3$ to 6). Statistically significant differences between groups were assessed using paired or unpaired, two-tailed, Student's t-tests. Statistically significant cytotoxicity of different groups was assessed using one-sample t-tests, with a threshold of 90%. Both tests were considered statistically significant at $p < 0.05$.

4.5 Results and Discussion

4.5.1 Optimization of Lyoprotectant Concentration

Freeze-thaw studies were carried out to identify potential lyoprotectants and their minimal concentration required to prevent particle aggregation. CS/DNA nanoparticles were formed, diluted to 25 μ g of DNA/mL in 0 to 3 % wt/vol lyoprotectant, freeze-thawed once, and then analyzed in DLS (Figure 4.1). Nanoparticles were severely aggregated following freeze-thawing in absence of lyoprotectant, whereas addition of various concentration of lyoprotectant prevented aggregation. Mannitol had poor cryoprotective potential compared to the other three agents tested: at least 1 % wt/vol was required to prevent large size increases post freeze-thawing, and higher PDIs were seen for all concentration of mannitol versus other lyoprotectants. Possible crystallization of mannitol could explain this inefficiency in preventing particle aggregation (Allison & Anchordoquy, 2000). Sucrose and trehalose, which form amorphous phases upon freezing, preserved both nanoparticle Z-average (80-100 nm) and PDI (0.19-0.24) upon freeze-thawing in concentrations of least 0.5 % wt/vol. Dextran was large enough to scatter light in DLS, leading to underestimation of Z-average and overestimation of PDI in concentrations higher

than 0.5 % wt/vol so that intensity mean distributions were used to determine particle size when dextran was present. As previously published for PEI/DNA polyplexes, 0.5 % wt/vol dextran was sufficient to prevent nanoparticle size increases or aggregation (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005).

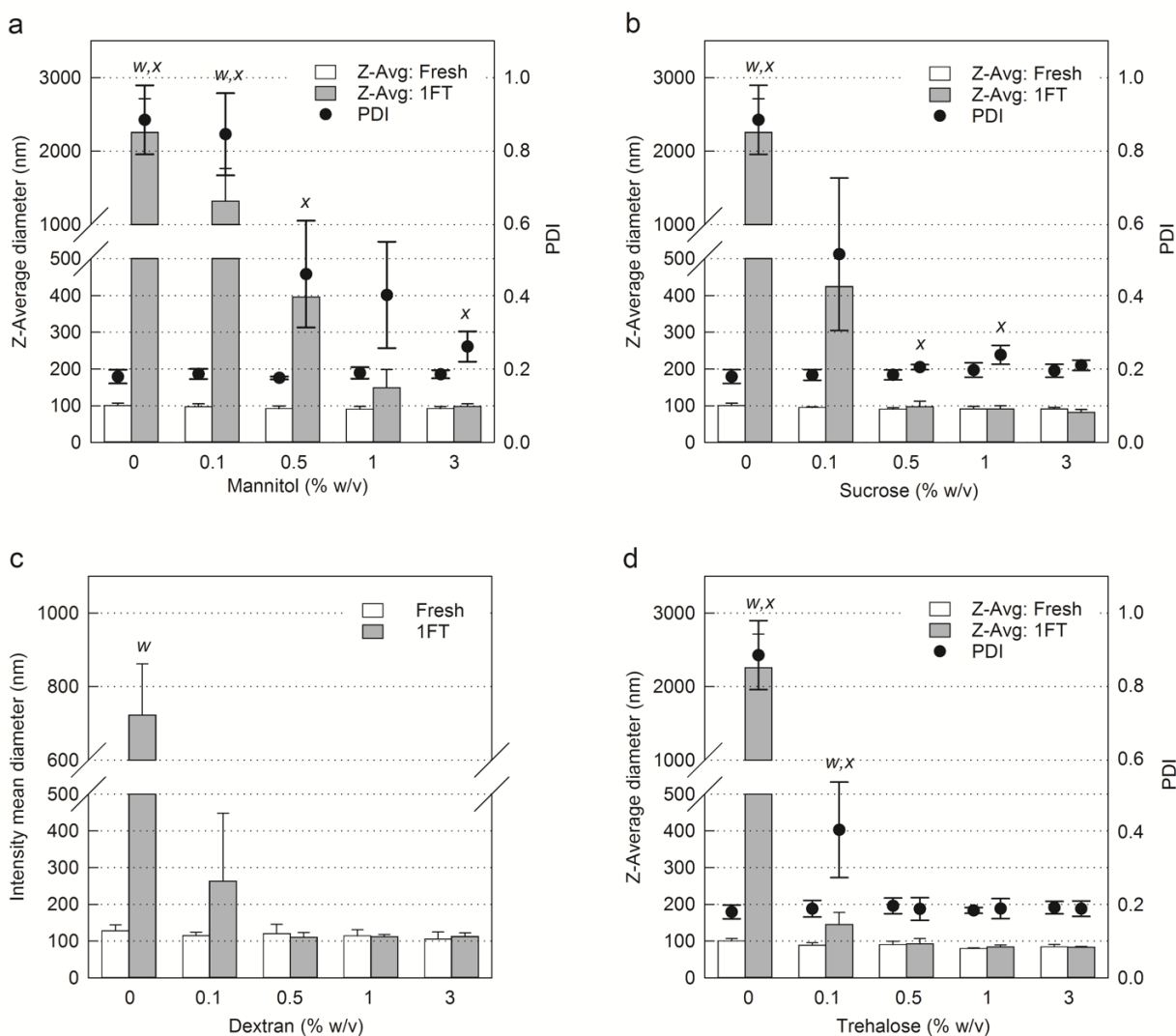


Figure 4.1 Freeze-Thaw (FT) evaluation of potential lyoprotectants for CS/DNA polyplexes. Z-average diameter and PDI, or intensity mean diameter, of polyplexes formulated with up to 3 % wt/vol mannitol (a), sucrose (b), dextran 5 kDa (c), or trehalose (d), prior to (fresh) and after a freeze-thaw cycle (1FT). DNA concentration was set at 25 $\mu\text{g/mL}$ following addition of lyoprotectant. About 0.5 % wt/vol sucrose, dextran, or trehalose is sufficient to prevent increase in Z-average diameter and PDI, or intensity mean diameter; 3 % wt/vol mannitol is insufficient to ensure similar cryoprotection. Size (w) and/or PDI (x) of FT polyplexes were significantly

different ($p < 0.05$) from fresh polyplexes of the same formulation. Mean \pm standard deviation ($n=4$).

4.5.2 Optimization of Buffer Concentration

Typically, freeze-dried compositions have buffer concentrations of 10 to 100 mM, to ensure buffering while minimising pain upon injection. Rather than subjecting samples to a freeze-thaw cycle, as previously done for the optimization of lyoprotectant concentrations, optimization of buffer concentration in the formulations was done by subjecting samples to a freeze-drying and rehydration cycle. CS/DNA nanoparticles were formed with 0.5 % wt/vol lyoprotectant and decreasing concentrations of histidine buffer (pH 6.5), using a final DNA concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$. Given the pK_a of the imidazole ring on histidine ($pK_{a2} = 6.1$), at pH 6.5 about 72% of histidine can buffer the formulation upon acidification through protonation of their imidazole ring, whereas the remaining 28% of histidine molecules are already protonated. The maximal histidine concentration used was set at 14 mM, to have approximately 10 mM of histidine available to buffer the formulation upon acidification during lyophilization. Histidine molar concentration was then gradually lowered to 3.5 mM, a molarity exceeding that of the ionisable groups of CS and DNA, the active ingredients, while being low enough to allow for significant concentration upon rehydration without exceeding 100 mM. These samples were freeze-dried, rehydrated to initial volume (Rh1X), and their Z-average and PDI were analyzed (Figure 4.2).

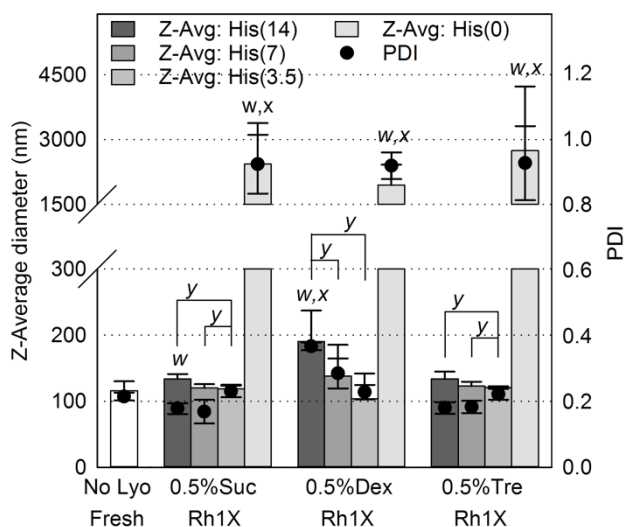


Figure 4.2 Optimization of histidine concentration for lyophilization of CS/DNA polyplexes. Polyplexes were formulated in 0.5 % wt/vol sucrose, dextran, or trehalose, and 0-14 mM histidine at pH 6.5, at a final DNA concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$. Samples were freeze-dried (FD), rehydrated to initial volume (Rh1X), and their Z-average diameter and PDI were compared to those of fresh polyplexes without excipients (No Lyo Fresh). 3.5 mM histidine was sufficient to prevent severe aggregation following Rh1X. Z-average (w) and/or PDI (x) of FD polyplexes were significantly different ($p < 0.05$) from fresh polyplexes without excipients (No Lyo Fresh). Significant differences ($p < 0.05$) in PDI (y) between polyplexes FD with concentrations of histidine varying from 14 to 3.5 mM. Mean \pm standard deviation ($n=4$).

The absence of histidine buffer led to severe aggregation of all lyophilized samples, independent of the lyoprotectant, with Z-average and PDI values above 1900 nm and 0.9 respectively (Figure 4.2). This could be due to polyplex insolubility after rehydration, the hydrochloric acid used to solubilise CS having evaporated during the freeze-drying cycle, or to hydrolysis of CS in the acidic cryoconcentrated phase. The former is supported by data showing that the average pH of formulations without histidine increases from 5.8 ± 0.2 , prior to FD, to 7.0 ± 0.2 after Rh1X, compared to no detectable pH change in the presence of histidine. None of the samples containing histidine and sucrose or trehalose were aggregated after Rh1X. Polyplexes in 3.5 mM histidine had significantly higher PDIs than those in 7 or 14 mM histidine following Rh1X, yet PDIs were below 0.25 for all histidine concentrations. Lower PDIs in the presence of histidine were also reported for PEI/DNA nanoparticles (Kasper et al., 2011) and might be due to

nanoparticle stabilisation through cation– π interactions between amine groups of polycations and aromatic imidazole rings of histidine molecules (Kamerzell et al., 2011). These cation– π interactions would be greater than cation–water interaction, and further explain the stabilizing effect of histidine on nanoparticles upon freeze-drying through a mechanism analogous to the water replacement hypothesis. In the presence of dextran, decreasing histidine concentration from 14 to 3.5 mM led to significantly smaller Z-averages after Rh1X (not indicated on Figure 4.2), whereas significant reductions in PDIs were seen upon decreasing histidine from 14 to 7 or 3.5 mM. Dextran having reduced conformational flexibility compared to sucrose or trehalose, its stabilizing hydrogen bonding interactions with nanoparticles may be hindered by histidine in high concentrations (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005; Kamerzell et al., 2011). A balance between dextran hydrogen bonding and histidine cation– π interactions could be required to stabilize CS/DNA polyplexes during FD. 3.5 mM histidine was sufficient to buffer all formulations, their average pH varying from 6.42 ± 0.05 , prior FD, to 6.50 ± 0.06 , after Rh1X, thus ensuring solubilisation of polyplexes upon rehydration.

4.5.3 Optimization of Nanoparticle Concentration upon Rehydration

To maximize final nanoparticle concentration in samples, and possibly reach the DNA concentrations of at least 1 mg/mL typically employed in clinical trials (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005), CS and DNA were diluted with the excipients prior to polyplex formation, resulting in formulations with 50 μ g of DNA/mL prior to FD, which was twice that previously used. Nanoparticle physicochemical properties were measured prior to FD, and after Rh1X and Rh20X (Figure 4.3), and their sizes and morphologies were assessed by SEM (Figure 4.4).

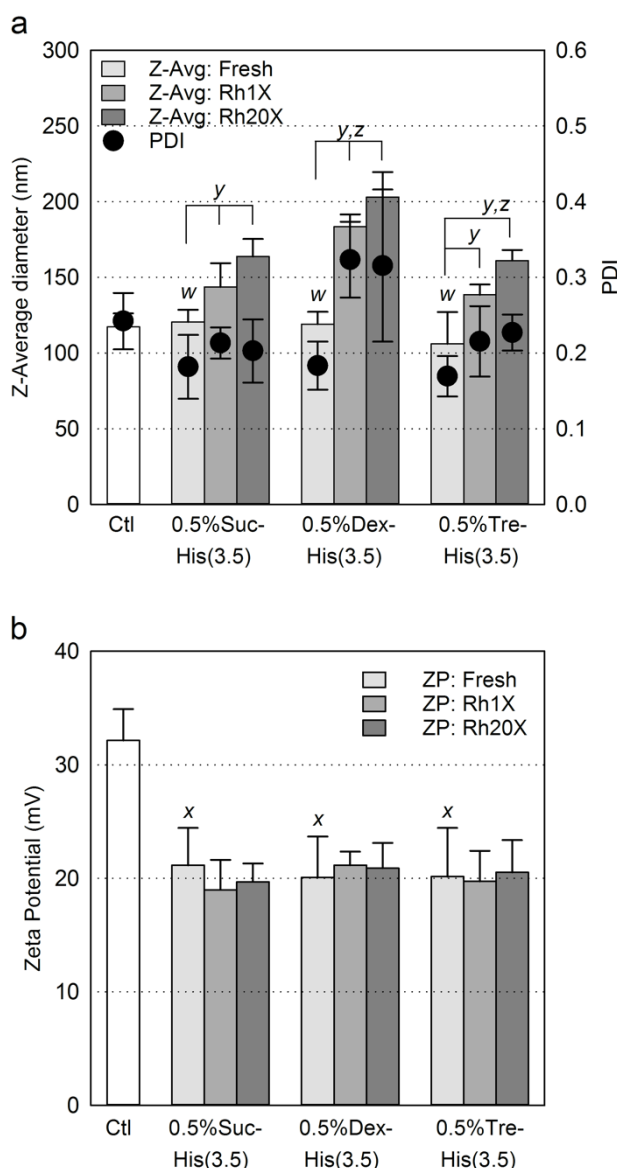


Figure 4.3 Optimization of nanoparticle concentration by freeze-drying and rehydration to lower volumes. Polyplexes were formulated with 0.5 % wt/vol sucrose, dextran, or trehalose, and 3.5 mM histidine at pH 6.5, at a DNA concentration of 50 μ g/mL. Formulations were freeze-dried, rehydrated to initial (Rh1X) or to 20-fold the initial concentration (Rh20X), and their physicochemical properties were compared to those of fresh polyplexes without excipient (Ctl). Formulations could be concentrated 20-fold without particle aggregation. PDI (w) and/or ZP (x) of fresh polyplexes in excipients were significantly different ($p < 0.05$) from fresh polyplexes without excipients (Ctl); Z-average (y) and/or PDI (z) of FD polyplexes were significantly different ($p < 0.05$) from fresh NPs in the same excipients. Mean \pm standard deviation ($n=6$).

Diluting CS and DNA with excipients prior to polyplex formation had no significant impact on fresh polyplex Z-averages, but their PDIs were significantly lower than without excipients (Ctl). All formulations showed significant increases in particle size following FD (Rh1X and Rh20X, Figure 4.3a), as compared to freshly prepared samples, whereas PDIs were significantly higher for polyplexes FD (Rh1X and Rh20X) in 0.5%Dex-His(3.5) and polyplexes Rh20X in 0.5%Tre-His(3.5). However, this approach allowed to double the initial DNA concentration prior to FD, from 25 to 50 $\mu\text{g/mL}$, while maintaining excipient concentrations constant. This increase in nanoparticle concentration allowed reaching a final DNA dose of 1 mg/mL following Rh20X, which is a suggested dose typically required for clinical trials (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2005). Rh20X formulations containing sucrose or trehalose yielded particles sizes below 200 nm, with PDIs below 0.25 (Figure 4.3a), and would therefore be suitable for *in vivo* parenchymal cell transfection (Kabanov, 1999). As previously discussed, histidine interaction with polyplexes led to significantly lower PDIs prior to FD. SEM imaging revealed polyplexes were more spherical in these samples due to the presence of histidine (not shown). Formulations containing excipients (lyoprotectant and histidine) had zeta potential varying between +19 and +21 mV, whether samples were freshly prepared, Rh1X or Rh20X; ZP was independent of the type of lyoprotectant or FD (Figure 4.3b). These ZP values were significantly lower than that of fresh CS/DNA polyplexes without excipients (+32 mV) due to the buffering effect of histidine at pH 6.5, which reduced charge density on CS (Buschmann et al., 2013). The final average pH of Rh20X formulations was 6.48 ± 0.02 . As anticipated, osmolalities of Rh20X formulations containing sucrose or trehalose were nearly isotonic, at 372 and 339 mOsm respectively, whereas all other formulations were hypotonic (< 200 mOsm).

Nanoparticles observed in SEM were mostly spherical and rod-like, whether freshly prepared or FD and rehydrated in presence of excipients (Figure 4.4). FD in the absence of excipients led to severe aggregation (Figure 4.4a). Mean particle sizes measured on SEM images for fresh polyplexes were significantly different between all 3 lyoprotectants, whereas, of all the FD formulations, significant differences were only seen between Rh20X samples containing sucrose and dextran. Polyplex sizes measured ranged within the following limits: fresh nanoparticles were 118-131 nm; Rh1X particles were 104-108 nm; and Rh20X nanoparticles were 130-142 nm. Polyplexes observed were smaller than those measured in DLS, which was expected since SEM

yields number-weighted average sizes and DLS yields intensity-weighted average sizes (Niebel et al., 2014).

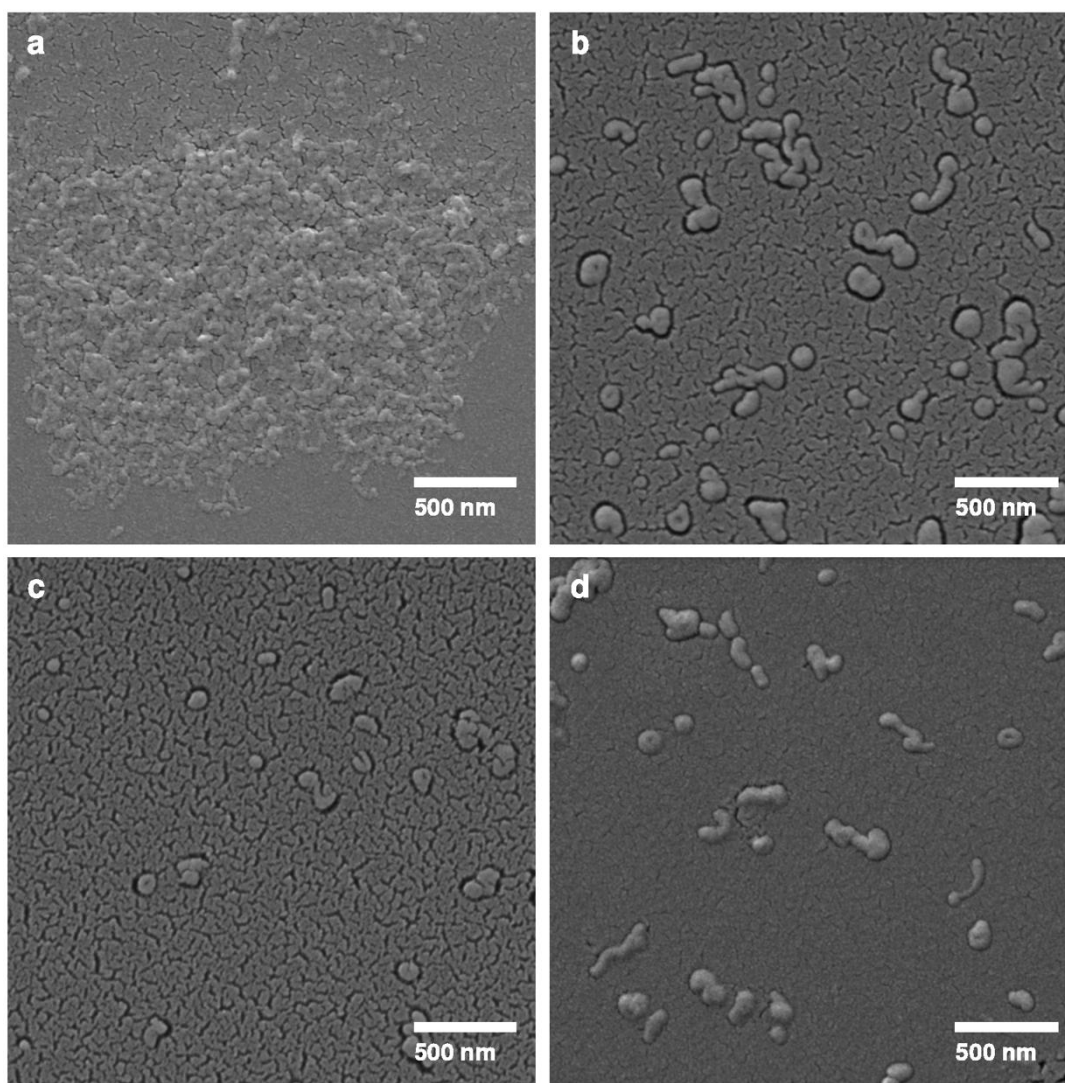


Figure 4.4 SEM images of CS/DNA polyplexes formulated without or with excipients, after freeze-drying and rehydration to 20-fold the initial concentration (Rh20X). Particles are severely aggregated in the absence of excipients (a), whereas their morphology was more spherical and their sizes were maintained in presence of both 0.5 % wt/vol sucrose (0.5%Suc), dextran (0.5%Dex), or trehalose (0.5%Tre), and 3.5 mM histidine at pH 6.5 (His(3.5)): (b) 0.5%Suc-His(3.5)-Rh20X, 142 ± 45 nm ($n=326$); (c) 0.5%Dex-His(3.5)-Rh20X, 130 ± 41 nm ($n=149$); and (d) 0.5%Tre-His(3.5)-Rh20X, 135 ± 39 nm ($n=160$).

4.5.4 *In Vitro* Transfection

Transfection and luciferase expression levels (Figure 4.5) were expressed as a percentage of the values obtained for nanoparticles freshly prepared in the absence of excipients (Ctl), which transfected 53% of cells and had luciferase expression levels of 6.9×10^7 RLU/min*mg of proteins. In the absence of excipients, FD nanoparticle transfection efficiencies and luciferase expression levels were no more than 20% and 15% of Ctl respectively. In the presence of excipients, transfection efficiency profiles were similar between lyoprotectants: the highest efficiency was obtained for fresh samples and lowest efficiency was obtained for Rh20X samples. The presence of excipients had no significant impact on transfection efficiency of fresh nanoparticles, whereas all FD formulations, with the exception of Rh1X with sucrose, led to significantly lower transfection efficiencies compared to fresh nanoparticles in the same excipients. More importantly, these formulations allowed reaching final DNA doses of 1 mg/mL while retaining at least 65% of the transfection efficiency of Ctl.

Luciferase expression levels obtained with dextran containing formulations had important variability, whether fresh or FD, suggesting this lyoprotectant may affect cell metabolism in vitro. In terms of gene expression, sucrose seemed a better lyoprotectant than trehalose, with mean luciferase levels higher than 100% following FD, compared to trehalose-containing formulations, which had mean luciferase levels as low as 75% of Ctl after Rh20X. It is however important to mention that only Rh20X samples containing sucrose had luciferase expression levels significantly lower than the fresh samples of the same formulation.

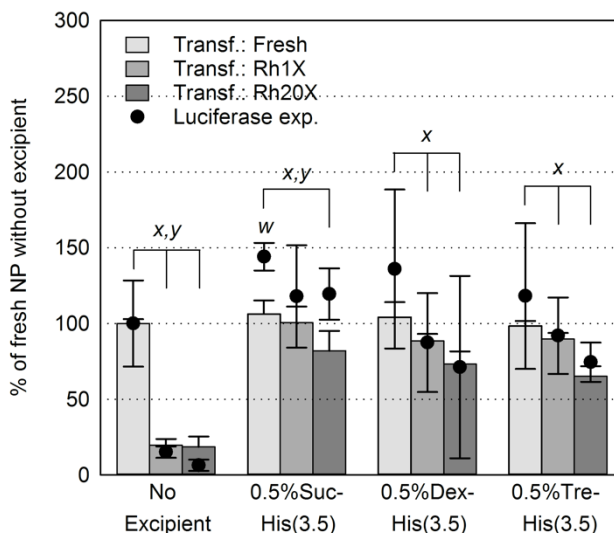


Figure 4.5 *In vitro* percentage of transfection and luciferase expression of optimized CS/DNA formulations. HEK 293 cells were transfected with 2.5 μ g of DNA per well using polyplexes formulated with 0.5 % wt/vol sucrose, dextran, or trehalose and 3.5 mM histidine at pH6.5. Formulations were freshly prepared, or freeze-dried and rehydrated to initial (Rh1X) or to 20-fold the initial concentration (Rh20X). Results are expressed as a percentage of the values obtained for fresh polyplexes without excipient. Lyoprotectant and buffer were necessary to preserve transfection efficiencies and luciferase expression levels after freeze-drying. Transfection efficiencies were similar between formulations; luciferase expression was highest with sucrose and most variable with dextran. Luciferase expression (w) of fresh polyplexes in excipients is significantly different ($p < 0.05$) from fresh polyplexes without excipients (No Excipient); transfection efficiency (x) and/or luciferase expression (y) of FD polyplexes were significantly different ($p < 0.05$) from fresh polyplexes in the same excipients. Mean \pm standard deviation ($n=3-5$).

It is currently unclear why transfection efficiency is lower post FD, with lowest transfection levels following Rh20X. Given all formulations yielded particles ranging from 100 to 200 nm, it is unlikely to be related to an increase in particle size. Transfection efficiency was lower following Rh1X, suggesting that the formulations would not fully protect polyplexes from the physical or chemical stresses associated with the FD and rehydration cycle. Rehydration of samples at 20-fold the initial concentration led to further decrease in transfection efficiency. At higher CS/DNA polyplex, free CS, and histidine concentrations, formulation colloidal stability

may be affected, leading to irreversible modifications of the nanoparticles. A hypothesis that would require further investigation is that the FD process itself, or rehydration to higher concentrations (Rh20X), would lead to a decrease in free CS in the formulations, the polycations accumulating at the surface of the polyplexes. This would provide an explanation for the increases in particle size observed after FD, and could potentially be responsible for the decrease in transfection efficiency, as previous work showed free CS is required to successfully transfect HEK 293 cells *in vitro* (Thibault, Marc et al., 2011).

4.5.5 *In Vitro* Cytotoxicity

Although both sucrose and trehalose-containing formulations have great potential for *in vivo* applications, given their near-isotonicity and their high transfection efficiency following Rh20X, trehalose was the preferred lyoprotectant retained for *in vitro* toxicity assays due to its superior properties with regards to stability in FD form, namely its higher glass transition temperature (Chang, L. & Pikal, 2009). Fresh, Rh1X or Rh20X CS/DNA nanoparticles formulated in 0.5 % wt/vol trehalose and 3.5 mM histidine (pH 6.5) were prepared. Of the Rh20X samples, part were diluted back to 1X prior to addition to cells (Rh20X-Dil.1X), and part were diluted back to 10X (Rh20X-Dil.10X), therefore subjecting cells to a polyplex concentration 10 times higher than those incubated with Fresh, Rh1X, or Rh20X-Dil.1X samples. CS/DNA polyplex formulations tested had no significant toxic effect on HEK 293 cells *in vitro*, with viability and metabolic activity levels at least 90% that of non-transfected samples incubated with corresponding excipient concentrations (Figure 4.6a). These results are in accordance with our previously published AlamarBlue data for CS/DNA polyplexes freshly prepared without excipients (Nimesh et al., 2010). Increasing CS/DNA formulation 10-fold had no significant impact on cell viability. Free CS cytotoxicity was also assessed since it represents the major form of CS upon CS/DNA formation at N/P ratio of 5 or above (Ma, Pei Lian et al., 2010b; Richard et al., 2013). As previously reported (Kean & Thanou, 2010), low Mn CS showed no significant *in vitro* toxicity at the concentrations tested (14 and 68 µg/mL).

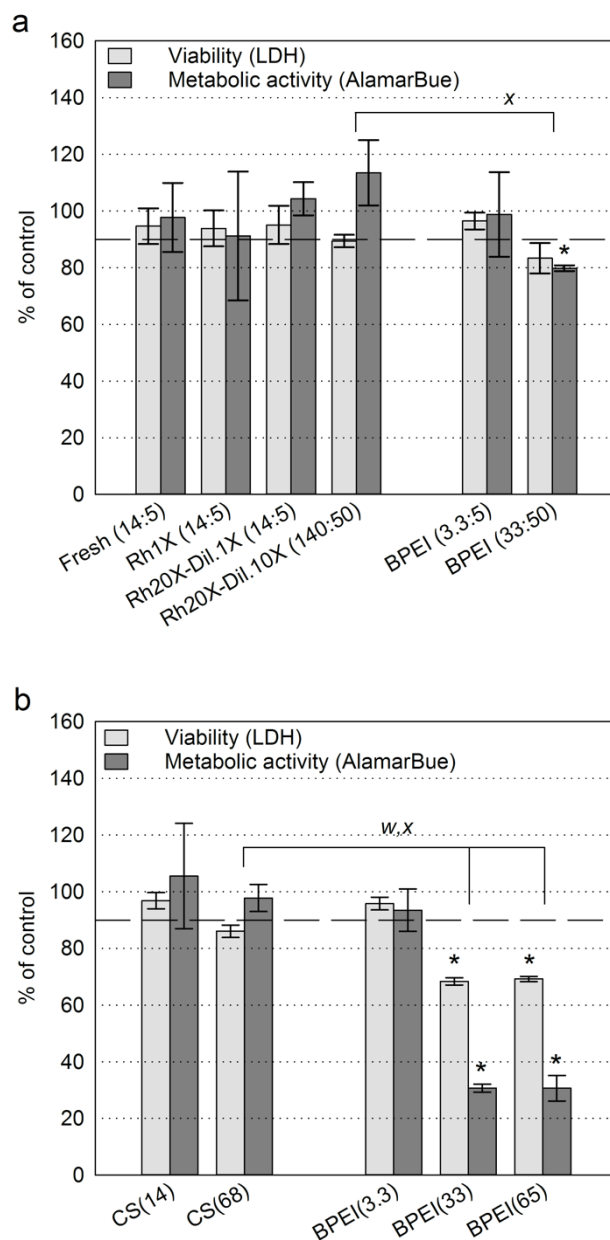


Figure 4.6 *In vitro* viability and metabolic activity of HEK 293 cells exposed to various concentrations of (a) CS/DNA polyplex formulations and PEI/DNA polyplexes and (b) free CS and free PEI. Labels include sample concentrations in terms of μg of polycation: μg of DNA (a) or μg of polycation only (b), per mL of media. For example, (a) PEI(3.3:5) stands for PEI/DNA polyplexes at a concentration of 3.3 μg of PEI and 5 μg of DNA/mL of media, whereas (b) PEI(65) is for 65 μg of PEI/mL of media. Cells were incubated 24h with samples prior to analysis. Fresh or freeze-dried CS/DNA polyplexes formulated with 0.5 % wt/vol trehalose and

3.5 mM of histidine at pH6.5 were used. Freeze-dried samples were rehydrated to initial (Rh1X), or rehydrated to 20-fold the initial concentration (Rh20X) and then diluted to initial (Dil.1X) or 10 times the initial concentration (Dil.10X) prior to use. Results are expressed as a percentage of controls without polyplexes or polycations. The dashed line represents the onset of cytotoxicity (90% viability). CS/DNA formulations and free CS showed no toxicity, whereas PEI/DNA polyplexes and free PEI were toxic at higher doses. *Cell viability or metabolic activity was significantly lower than 90% ($p < 0.05$). Cell viability (w) and/or metabolic activity (x) were significantly different ($p < 0.05$) between CS/DNA and BPEI/DNA polyplexes (at same DNA concentration), or between free CS and BPEI (at similar polycation concentrations). Mean \pm standard deviation (n=3).

Two BPEI/DNA nanoparticles (N/P = 5) formulations were tested on cells: the former was prepared at same DNA concentration as fresh, Rh1X or Rh20X-Dil.1X CS/DNA polyplexes, the latter, at 10 times that concentration, therefore the same DNA concentration as Rh20X-Dil.10X CS/DNA polyplexes. The low concentration BPEI/DNA formulation showed no significant cell toxicity, whereas the more concentrated BPEI/DNA formulation (33 μ g of BPEI and 50 μ g of DNA/ mL of media) showed metabolic activity significantly lower than 90%. Previous data reported higher in vitro cytotoxicities for PEI/DNA polyplexes, for a similar PEI dose as the highest shown in Figure 4.6a (Moghimi et al., 2005). These polyplexes were however prepared at N/P ratio of 23, representing much higher doses of free PEI in the samples, thus partly explaining their higher cytotoxicities (Clamme et al., 2003; Moghimi et al., 2005). More importantly, cells incubated with the same CS/DNA polyplex concentration (50 μ g of DNA/mL of media) had significantly higher metabolic activity despite a CS concentration 4.25-fold higher than that of BPEI in the formulations. Diluted free BPEI (25kDa) at 3.3 μ g/mL was non-toxic to HEK 293 cells, whereas concentrations of 33 and 65 μ g/mL of media led to significant toxicity, with cell viabilities of 68% and metabolic activities of 31%. Both cell viability and metabolic activity of free CS at 68 μ g/mL were significantly higher than those of free BPEI at 65 or even 33 μ g/mL. Overall, CS (8.3 kDa, 92.5 % DDA) was less cytotoxic than BPEI (25 kDa), whether bound to DNA or not.

4.6 Conclusions

This study identified formulations that preserve CS/DNA polyplex physicochemical properties and biological activity after lyophilization using minimal amounts of both lyoprotectant and buffer. Nanoparticles lyophilized in 0.5 % wt/vol sucrose, dextran 5 kDa, or trehalose, and 3.5 mM histidine (pH 6.5), could be rehydrated to a concentration up to 20-fold higher (Rh20X) while maintaining isotonicity, reaching clinically relevant concentrations of ~1 mg of DNA/mL. Sucrose and trehalose-containing formulations resulted in more reproducible in vitro transfection efficiency, and were near-isotonic following Rh20X. Cell viability and metabolic activity in vitro was not affected by these formulations. Future analysis of the stability profiles of these formulations over short and long-term storage, as well as evaluation of their in vivo efficiency, will advance these CS/DNA gene delivery systems towards clinical use.

4.7 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant No. CRD PJ 445241 12), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, Innovation Polymères Consortium, and ANRis Pharmaceuticals Inc, of which K.B. is an employee.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: LYOPHILIZATION AND CONCENTRATION OF CHITOSAN/SIRNA POLYPLEXES: EFFECTS OF OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCE, BUFFER COMPOSITION, AND COATING WITH HYALURONIC ACID

Daniel Veilleux,[†] Anik Chevrier,[†] Rajesh Krishnan Gopalakrishna Panicker,[†] Kristof Biniecki,[‡]
Marc Lavertu,[†] and Michael D. Buschmann^{*,†}

[†]Institute of Biomedical Engineering, Polytechnique Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3A7; Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3A7;

[‡]ANRis Pharmaceuticals Inc, Kirkland, Quebec, Canada, H9H 4R9.

5.1 Abstract

Chitosan/siRNA polyplexes have great therapeutic potential for protein regulation by gene knockdown. Their clinical application requires the development of concentrated, hemocompatible, neutral pH formulations for intravenous therapies. Understanding the impact specific oligonucleotide sequences, buffers, and pH on polyplex properties is necessary. Increasing anionic buffer pH and ionic strength led to the formation of larger or aggregated polyplexes. Therefore, concentrations of compatible buffer were optimized for freeze-drying of uncoated or hyaluronic acid coated polyplexes. Oligonucleotide sequences influenced the properties of polyplexes formed at low amine to phosphate ratio, as well as their stability following freeze-drying. Nanoparticles displayed greater stability for ODN vs siRNA; AT-rich vs GC-rich; and overhangs vs blunt ends. CS/siRNA polyplexes were non-cytotoxic and preserved their biological activity after rehydration at 20-fold their initial concentration. HA-coated polyplexes at pH ~7 displayed increased hemocompatibility. These concentrated formulations represent an important step towards the clinical use of chitosan-based oligonucleotide intravenous delivery systems.

5.2 Keywords

Chitosan, ODN/siRNA delivery, non-viral gene delivery, nanoparticles, freeze-drying/lyophilization, hemocompatibility.

5.3 Introduction

Efforts to develop and optimize safe, efficient non-viral polymeric gene delivery vectors has grown steadily in the last decades. Early work by our group has shown that, by tailoring the properties of chitosan (CS), a natural cationic polysaccharide that self-assembles with nucleic acids to form polyplexes, DNA cargo could be delivered to cells for specific therapeutic applications *in vivo* (Jean, M. et al., 2011; Jean, M. et al., 2009). *In vitro* studies showed that transfection efficiency is a function of polyplex stability, which can be modulated by the CS molecular weight (Mw) and degree of deacetylation (DDA), as well as pH and amine to phosphate (N/P) ratio in the complexes (Lavertu, Marc et al., 2006; Nimesh et al., 2010; Thibault, Marc et al., 2011; Thibault, M. et al., 2010). With the advent of small interfering RNA (siRNA) technology, know-how gained with CS was applied to generate a new class of therapeutic polyplexes aimed at regulating protein expression (Alameh et al., 2012; Jean, Myriam et al., 2012). However, research showed that higher Mw of CS and/or N/P ratios may be required to stabilize CS/siRNA polyplexes and achieve high gene knock down (Mao, S. et al., 2010). This could not only be due to the large difference in size between plasmid DNA and siRNA, but also to the more compact helical conformation of RNA compared to DNA, which would alter the spacing of phosphate groups on the oligoribonucleotides and reduce the condensation efficiency by multivalent cations (Tolokh et al., 2014; Wu et al., 2015). Studies on short DNA duplex (~280 bp) has also shown that AT/GC-content would influence the condensation efficiency of polyamines, therefore nucleic acid sequences could influence CS/siRNA polyplex formation (Kabir & Suresh Kumar, 2013). Yet, CS/siRNA formulations have been reported in more than 20 animal studies so far, using sequences targeting: 1) genes involved with various cancers or diseases, for example VEGF or ApoB; or 2) housekeeping genes or fluorescence protein genes, such as GAPDH, GFP or RFP, to demonstrate *in vivo* knockdown in wild type and transgenic animal models (Buschmann et al., 2013; Corbet et al., 2016; Danhier et al., 2015; He et al., 2015; Van Woensel et al., 2016; Xie et al., 2014; Yhee et al., 2015).

Although different routes of administration have shown promising results, intravenous (IV) administration of these polyplexes remains a challenge, in part since chitosan may cause hemolysis and hemagglutination (Carreño-Gómez & Duncan, 1997; Rao & Sharma, 1997). Several surface modifications have been suggested to circumvent this issue and enhance the pharmacokinetics of CS/nucleic acid nanoparticles (Buschmann et al., 2013). One approach pursued here is the addition of a hyaluronic acid (HA) coating on the CS/nucleic acid polyplexes through electrostatic interactions between the cationic amine groups of CS and the anionic carboxyl groups of HA. HA is a non-toxic, highly hydrophilic, hemocompatible, high molecular weight anionic glycosaminoglycan widely distributed throughout extracellular matrices. HA also binds to the CD44 receptor, which is overexpressed in a wide variety of cancer cells, and therefore has been extensively studied as therapeutic targeting agent (Platt & Szoka, 2008).

Another challenge associated with CS/nucleic acid self-assembled systems is the need to prepare them in dilute conditions in order to ensure consistent production of small uniform polyplexes, therefore limiting concentration and dose of clinical applications (MacLaughlin et al., 1998; Xu & Anchordoquy, 2011). Furthermore, these colloidal systems were shown to be susceptible to physical and chemical instability upon long-term storage in solution (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001; Romøren et al., 2004). Lyophilization, also referred to as freeze-drying (FD), is a low temperature dehydration process widely used in the pharmaceutical industry to stabilize injectable formulations for long-term storage. Although not its main purpose, it can also be used to concentrate dehydrated therapeutic agents prior to injection by rehydrating them in reduced volumes. An example in our previous work with CS/DNA polyplexes showed that they can be lyophilized in 0.5% wt/vol trehalose and 3.5 mM histidine buffer at pH 6.5, and then rehydrated to 20-fold their initial concentration (~ final concentration of 1 mg of DNA/mL), to near-isotonicity, without losing biological activity (Veilleux et al., 2016). Knowing that injections need to be near-isotonic (e.g. 10% sucrose), the choice of excipients and the identification of the minimal concentrations required to preserve polyplex integrity during lyophilization are paramount in order to maximize the final attainable nucleic acid concentration post reconstitution (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). In fact, Andersen et al. suggested that 5 to 10% sucrose was necessary to preserve CS/siRNA polyplexes size and biological activity after rehydration, suggesting their formulations could be concentrated by no more than 2-fold to remain isotonic (Andersen et al., 2008).

The main purpose of this study was to develop hemocompatible, near-neutral pH, CS/siRNA polyplex compositions that could be lyophilized and concentrated upon rehydration, while preserving nanoparticle physicochemical properties and biological activity. In addition, the current work examined the possibility of using ODN as an affordable replacement to siRNA to perform pre-screening of freeze-dried compositions, as well as evaluate the impact of sequence variations on these CS/oligonucleotide formulations. Studies were performed to identify potential buffers compatible with uncoated and HA-coated CS/oligonucleotide polyplexes, as well as to understand the mechanisms driving particle size increase in presence of certain buffers. Minimal concentrations of histidine and Tris-maleic acid buffer required to maintain composition pH at 6.5 or 7, and prevent uncoated and HA-coated polyplex aggregation following lyophilization in 0.5 % wt/vol trehalose and rehydration to higher concentrations, were identified for polyplexes made with ODN. Efficiency of these optimized compositions to preserve polyplex physicochemical properties, namely their Z-average and PDI, was then compared between polyplexes made using different oligonucleotides: ODNs and siRNAs, targeting Apob or eGFP genes, with various duplex overhangs. The nucleic acid condensation efficiency of CS was assessed for these polyplexes using a dye exclusion assay, and a subset of oligonucleotides was further investigated by measuring polyplex isoelectric point and size or aggregation as a function of the CS N/P ratio in the composition. The silencing efficiency of CS/eGFP-siRNA polyplexes, as well as their effect on cell metabolic activity, was measured in human non-small lung carcinoma cells expressing enhanced green fluorescence proteins (eGFP⁺ H1299). Hemocompatibility of lyophilized and concentrated uncoated (N/P = 2 or 5) and HA-coated (pH 6.5 or 7) CS/ApoB-siRNA compositions was also assessed.

5.4 Material and Methods

5.4.1 Materials

CS was from Marinard. Deuterium oxide (Cat #151882), deuterium chloride 35%wt in deuterium oxide (Cat # 543047), sodium hydroxide (Cat #S5881), sodium nitrite (Cat #431605), 1N hydrochloric acid solution (Cat #318949), glacial acetic acid (Cat #338826), sodium azide (Cat #S2002), sodium acetate trihydrate (Cat #S7670), 1N sodium hydroxide solution (Cat #319511), trehalose dihydrate (Cat #T0167), L-histidine (Cat #H6034), sodium phosphate monobasic (Cat

#S5011), maleic acid (Cat #M0375), sodium chloride (Cat #S6191), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) hydrate (Cat #M2933), sodium bicarbonate (Cat #S5761), D-(+)-glucose (Cat #G7021), triton X-100 (Cat #T8532), poly-L-Lysine hydrobromide (PLL, Cat #P1399), polyethylene glycol (PEG 8 kDa, Cat #P1458), hexacyanoferrate (III) (Cat #31253), potassium phosphate monobasic (Cat #04243), potassium cyanide (Cat #31252), phosphate buffered saline (PBS) without calcium chloride and magnesium chloride (Cat #D5652), orange II sodium salt (Cat #195235), and phosphotungstic acid (Cat #HT152) were from Sigma-Aldrich. Sodium hyaluronate (HA, MW = 866 kDa, Cat #HA1M-1) was from Lifecore Biomedical. UltraPure Tris (Cat #15504-020), RPMI 1640 (Cat #31800-022), Fetal Bovine Serum (FBS, Cat #26140), TrypLE Express (Cat #12604-013), GlutaMAX 100X (Cat #35050-061), Geneticin G418 sulfate (Cat #10131-027), Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Cat #R11490), and AlamarBlue Cell Viability Reagent (Cat #DAL1025) were from ThermoFisher Scientific. Modified RPMI 1640 medium (Cat #30-2001) was from ATCC. A human non-small lung carcinoma (H1299) cell line stably expressing enhanced green fluorescence protein (eGFP⁺ H1299) was donated by Dr Jorgen Kjems (AARHUS University, Denmark) upon approval of Dr Anne Chauchereau. Stanbio hemoglobin standards (Cat #SB 0325 006) was from Fisher Scientific. Serum vials (Cat #223683), and aluminum seals (Cat #22418201) were from VWR. Butyl stoppers (Cat #73828-13) were from Kimble Chase. Optitran BA-S 83 membrane (Cat #10439394) was from Whatmann. Custom made oligodeoxynucleotide (ODN) sequences were from Integrated DNA Technologies (IDT). Custom made small interfering RNA (siRNA) sequences, DharmaFECT 2 (Cat #T-2002-01), and ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1 (Cat #D-001810-01-50) were from GE Healthcare Dharmacon. Sequences targeting for apolipoprotein B (ApoB) or enhanced green fluorescence protein (eGFP) were used, with two different types of overhangs each: ApoB-aODN or -asiRNA, asymmetrical 21-mer duplexes with a blunt end at the 3' end of the sense strand and an additional 2 nt on the 3' end of the anti-sense strand; ApoB-sODN or -ssiRNA, 21-mers with sticky ends of 4 nt on the 3' end of the anti-sense strand and 2 nt on the 3' end of the sense strand; eGFP-ODN or -siRNA, canonical 21-mers; and eGFP-bODN or -bsiRNA, blunt 21-mer duplexes. ApoB-asiRNA was from Zimmermann et al. (Zimmermann et al., 2006), whereas eGFP-siRNA was from Howard et al. (Howard et al., 2006). Detailed oligonucleotide sequences are provided in Supporting Information.

5.4.2 Preparation of CS/NA Polyplex Formulations

CS was heterogeneously deacetylated using concentrated sodium hydroxide and was depolymerized using nitrous acid, as previously described (Lavertu, Marc et al., 2006). A 92.5 % degree of deacetylation (DDA) was measured by ^1H NMR as described in Lavertu et al. (Lavertu, M et al., 2003), and a 9.2 kDa (PDI = 1.54) number-average molecular mass (M_n) was determined by gel permeation chromatography (GPC)-multi-angle light scattering (MALS), as in Nguyen et al. (Nguyen et al., 2009). Dry CS was dissolved in 28 mM HCl at RT, to a stock solution concentration of 5 mg/mL; dry HA was dissolved in nuclease free water at RT, to a stock solution concentration of 2 mg/mL. Unless otherwise indicated, CS and HA stock solutions were sterile filtered and diluted to mixing concentrations listed in Table 5.1 using nuclease free water; and/or sterile trehalose; and/or histidine (H), Tris-maleic acid (TMA), sodium phosphate (P), or maleic acid (MA). ODNs and siRNAs were rehydrated to 1 mg/mL in nuclease free water, and their concentration was measured by UV spectrophotometry (DU 640 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using the molar extinction coefficients provided by the suppliers (see Supporting Information). ODNs and siRNAs were then diluted to 200 $\mu\text{g/mL}$ using nuclease free water and/or excipients, as described for CS. Uncoated polyplexes were formed at N/P = 1, 2, 2.5 or 5 by mixing equal volumes of CS and oligonucleotide, pipetting CS up and down approximately 10 times immediately following addition to ODN or siRNA. Samples were left to stabilize at RT for 10 minutes prior to use. HA-coated polyplexes were formed by adding HA to nanoparticles formed at N/P = 2 or 2.5, at an amine to phosphate to carboxyl (N/P/C) ratio of 2/1/1.5 or 2.5/1/2 respectively. HA was added to the uncoated nanoparticles in a HA : polyplex volumetric ratio of 1:2, mixing the final solution up and down approximately 10 times using a pipette.

Table 5.1 Mixing concentrations of CS and HA to form polyplexes at different N/P and N/P/C ratios

Oligonucleotide Type	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	CS				HA	
		N/P = 1 ($\mu\text{g/mL}$)	N/P = 2 ($\mu\text{g/mL}$)	N/P = 2.5 ($\mu\text{g/mL}$)	N/P = 5 ($\mu\text{g/mL}$)	N/P/C = 2/1/1.5 ($\mu\text{g/mL}$)	N/P/C = 2.5/1/2 ($\mu\text{g/mL}$)
ODN	200	116	233	293	585	394	525
siRNA	200	112	224	281	563	378	504

5.4.3 Freeze-Drying (FD) and Rehydration of Polyplex Formulations

Samples of 200 μ L or 1 mL were freeze-dried in 2 or 10 mL serum vials respectively, using 13 or 20 mm butyl lyophilization stoppers. They were protected from dust and bacterial contamination using a Whatmann Optitran BA-S 83 membrane to cover the sample trays. Samples were freeze-dried (FD) in a Laboratory Series Freeze-Dryer PC/PLC (Millrock Technology, Kingston, NY, USA) using the following cycle: 1) rapidly cooling to 5 $^{\circ}$ C and holding for 30 min, rapidly cooling to -5 $^{\circ}$ C and holding for 30 min, then cooling from -5 to -40 $^{\circ}$ C, at 1 $^{\circ}$ C/min, and holding for 2 h; 2) primary drying for 48 h at -40 $^{\circ}$ C and 100 mTorr; and 3) secondary drying at 100 mTorr, increasing shelf temperature to 30 $^{\circ}$ C, at 0.1 $^{\circ}$ C/min, and holding for 6 h. Samples were backfilled with argon, stoppered, crimped, and stored at 4 $^{\circ}$ C until reconstitution, 10 min prior to use. The FD temperature and vacuum were chosen based on our previous work with similar formulations (Veilleux et al., 2016). Resulting FD cakes were white and showed only minimal shrinkage.

FD cakes in 2 mL vials were reconstituted to their initial concentration (Rh1X) or to 20 times their initial concentration (Rh20X) using 200 or 10 μ L of nuclease free water respectively; FD cakes in 1 mL vials were reconstituted to 10 times their initial concentration (Rh10X) using 100 μ L of nuclease free water. All formulations were rehydrated within 5 min. As previously described, Rh20X samples were diluted back to 1X with nuclease free water 10 min post reconstitution, prior to analysis (Veilleux et al., 2016). Samples of at least 50 μ L were used to assess pH using an Orion Model A720+ pH meter equipped with a Ross glass combination micro electrode (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.4.4 Polyplex Size, Surface Charge, and Concentration

Nanoparticle hydrodynamic diameters (Z-average) and polydispersity indexes (PDI) were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), using disposable microcuvettes. Samples were analyzed three consecutive times at 25 $^{\circ}$ C, each result being the average of 12 to 20 successive readings (10 second photon counts/reading). Particle zeta potential (ZP) was measured by Laser Doppler Velocimetry (LDV) with the Zetasizer Nano ZS, using disposable capillary cells. Unless otherwise indicated, 100 μ L samples were diluted to a volume of 800 μ L and a final NaCl concentration of 10mM, and were

analyzed three consecutive times at 25°C. ZP were calculated from nanoparticle electrophoretic mobilities using the Smoluchowski equation (Kaszuba et al., 2010).

Polyplex concentrations and number average diameters were measured by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) with a NanoSight NS500 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipped with a 405 nm laser and an EMCCD camera. Depending on the formulation, samples were diluted 100 to 3200-fold with excipient or nuclease free water, in order to track an average of 10 to 50 nanoparticles per frame during the analysis. For each sample, nanoparticle concentration and diameter were averaged from five consecutive video captures of 60 sec at 25 °C, loading new sample volumes in the observation chamber between each capture.

5.4.5 Quantification of Free Chitosan by Orange II Assay

The proportion of free CS in CS/ODN samples prepared at N/P = 2 in various concentrations of buffers was determined by the Orange II dye depletion method established by Drogoz et al. (Drogoz et al., 2007). Samples were centrifuged 45 min at 60000 rpm to spin down polyplexes (Optima MAX-E, TLA-110 fixed rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A supernatant aliquot of 10 µL was collected for each sample and diluted 20-fold using the same buffer concentration as in the initial formulation. Diluted supernatants were further diluted 4-fold with 50 mM acetic acid/sodium acetate buffer at pH 4.0, therefore ensuring Orange II sulfonic acid groups are in excess relative to fully protonated CS amine groups during the assay. Orange II, prepared at a concentration of 1 mM in the acetic acid/sodium acetate buffer, was added to diluted supernatants, at a volumetric ratio of 1:32, and mixed by vortexing. Samples were incubated 5 min to allow formation of CS/Orange II complexes, which were then precipitated by centrifugation at 20,000 g for 30 min (IEC Miromax, 891 rotor, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). At least 500 µL of supernatant containing the unbound Orange II was transferred to disposable microcuvettes and the absorbance was measured at 484 nm (DU 640 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The free CS content was calculated using calibration curves obtained from CS dilutions prepared in the same buffers.

5.4.6 Oligonucleotide Condensation Assay

The efficiency of CS to condense various ODN and siRNA sequences was studied in an exclusion assay using the fluorescent intercalating dye RiboGreen. CS/ODN and CS/siRNA

polyplexes, prepared at N/P ratios of 0 (free nucleic acid), 1, 2, and 2.5 in excipients, were diluted 1000-fold in the same excipients, and then, for each sample, 3 aliquots of 100 μ L were transferred to a black 96-well plate. An equal volume of excipient solution was transferred to 6 wells to be used as blanks. The RiboGreen dye was diluted 2,000-fold in the same excipients as the polyplexes, as described by the manufacturer for the low-range assay, and 100 μ L was added to each sample in the 96-well plate. Samples were incubated 5 min in the dark, and then fluorescence (excitation 485 nm/emission 535 nm) was read on an Infinite M200 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland).

5.4.7 Polyplex Transmission Electron Microscopy Imaging

A 5 μ L drop of the sample was placed on a 200 mesh carbon coated copper grid (Electron microscopy sciences) and allowed to air dry ~30 min after covering with a plastic lid. Nanoparticles were stained 15 min using a 10 % wt/vol phosphotungstic acid solution, and then the stain was removed by blotting to avoid crystallization on samples. Samples were washed twice using RNase free water. Bright field images were obtained on a Tecnai T12 microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA) operating at an acceleration voltage of 120 kV. Four random areas around the grid center were selected for imaging and images were obtained at magnification ranging from 6500X to 150000X (1 μ m to 50 nm).

5.4.8 *In vitro* transfection

Previous work with CS/DNA polyplexes showed that *in vitro* transfection efficiency is maximal in slightly acidic medium (pH 6.5), and that free chitosan (N/P = 5) is required to facilitate endolysosomal release and gene expression (Nimesh et al., 2010; Thibault, Marc et al., 2011). Under these conditions, polyplexes are positively charged, given their pK_{ap} of ~ 7 (Richard et al., 2013). Consequently, eGFP⁺ H1299 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 17.85 mM sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 1 mM sodium private, and 10% FBS, at 37°C in 5% CO₂. Prior to transfection, cells were maintained in 0.8 g/L Geneticin G418 for clonal selection of eGFP⁺ cells. 24-well culture plates were seeded with 45,000 cells in 500 μ l of culture medium, and incubated 24h to reach ~70% confluency for transfection. RPMI 1640 with 5 mM MES, 10 mM sodium bicarbonate, and 4.5 g/L glucose, subsequently referred to as transfection medium, was equilibrated overnight at 37°C, 5% CO₂.

and pH was adjusted to 6.5 with 1 N sterile HCl prior to transfection. Culture medium was removed from cells and replaced with 473 μL of transfection medium and 27 μL of CS/eGFP-siRNA (N/P = 5) polyplex formulations diluted 4-fold beforehand using excipient or nuclease free water, for a final siRNA concentration of 100 nM or 0.00135 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Non-transfected controls were obtained by replacing polyplex formulations in the above with nuclease free water or excipients. Cells were incubated 5h with the samples, at 37°C, in 5% CO_2 , then medium was removed and cells were replenished with 500 μL of culture medium. After an additional 19h incubation period, cell viability was assessed through quantification of their metabolic activity using AlamarBlue. Cells were incubated a final 24h prior to monitoring their morphology by fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert TV 100, GmbH Germany) and quantifying their eGFP expression levels by flow cytometry. DharmaFECT 2 was used as positive control according to the manufacturer recommendation, and was incubated with the cells until analysis by flow cytometry. Non-targeting siRNA was used as a negative control.

5.4.9 Cell Viability

Transfected and non-transfected cell viability, or metabolic activity, was assessed by adding 50 μL of AlamarBlue reagent to each sample well and incubating 4h at 37°C, in 5% CO_2 . For each sample, 3 aliquots of 100 μL of medium containing reduced AlamarBlue were each transferred to a well of a clear 96-well plate. Absorbance was measured at 570 nm, using 600 nm as reference wavelength, and data was analyzed using the method described by the manufacturer.

5.4.10 Quantification of eGFP expression by Flow Cytometry

Cells were trypsinized (TrypLE) and transferred to 5 mL flow cytometry tubes. For each sample, eGFP expression was measured for 20,000 events using a MoFlo XDP cytometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) equipped with a 488 nm argon laser for excitation (model ENTCII-621, Coherent, Santa Clara, CA, USA) and a 510/20nm (FL1) band pass filter, with photomultiplier tube voltages of 500-550, to detect fluorescence. Forward (FSC) and side (SSC) scatter were used to establish a collection gate to exclude dead cells and debris. The Summit software (V4.3.02, Build 2451) was used to display the cell population within the collection gate on a FL1 Log versus Counts graph, and to determine their mean fluorescence. EGFP silencing was expressed in terms of mean fluorescence of treated cells relative to non-transfected controls.

5.4.11 Hemocompatibility assays

Hemolytic properties of nanoparticle formulations were tested according to ASTM E2524 (*ASTM E2524-08(2013), Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles*); hemagglutinative properties, according to the method described by Evani and Ramasubramanian (Evani & Ramasubramanian, 2001). FD samples of 1 mL were Rh10X, and then serially diluted to final siRNA concentrations of 1, 0.5, 0.25, and 0.125 mg/mL, for uncoated polyplexes, and 0.667, 0.334, 0.167, and 0.083 mg/mL, for HA-coated samples. Positive controls included 2 mg/mL CS, 10 mg/mL poly-L-lysine (PLL), and 10 % v/v Triton X-100; negative controls included 40 % w/w polyethylene glycol (PEG, 8 kDa), 5 % wt/vol trehalose, 10 mM histidine at pH 6.5, and 1.26 mg/mL HA. A total of 100 μ L of sample or control was added to centrifuge tubes containing 700 μ L of prewarmed PBS at pH 6.5 or 7, depending on the initial test formulation pH. A volume of 100 μ L of citrated blood, diluted to a hemoglobin concentration of 10 ± 1 mg/mL with PBS prior to performing the assay (TBHd), was added to the samples and gently mixed by inversion. The plasma-free hemoglobin (PFH) in the blood used was measured at 0.29 mg/mL prior to initiating the assay.

Test samples were separated into two volumes: 700 μ L for evaluation of hemolysis and 200 μ L for evaluation of hemagglutination. Sample used for the hemolysis assay were incubated for 3 h in a water bath at 37 °C. Every 30 min, they were visually inspected for nanoparticle flocculation, dispersion, sinking or floating, and were mixed. After incubation, samples were centrifuged 15 min at 800 g to collect the supernatant for colorimetric determination of hemolysis. For each sample and control, 100 μ L of the supernatant was transferred into two wells of a 96-well plate, and then add 100 μ L of cyanmethemoglobin reagent. Quadruplicates of 200 μ L of cyanmethemoglobin reagent (blanks), calibration standard and quality control standards were added to the plate, as well as six replicates of the diluted total blood hemoglobin (see ASTM E2524 for detail). The plate was covered, shaken for 2 min, and then absorbance was measured at 540 nm on an Infinite M200 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland). A four-parameter regression algorithm was used to obtain the calibration curve, which was then used to calculate the hemoglobin concentration in the supernatant of each sample (PFH_{sample}). The percentage of hemolysis is expressed as follows:

$$\text{Hemolysis (\%)} = 100 \times \text{PFH}_{\text{sample}} / \text{TBHd} \quad (4.1)$$

Hemolysis readings above 5 % indicate the material or formulation will cause damage to the red blood cells. Hemagglutination was determined qualitatively after incubation of the 200 μ L test samples for 3 h at 37 °C in a U-shaped 96-well plate. Results were positive if a granular or irregular ring of erythrocytes covered more than half of the well bottom.

5.4.12 Statistical Analysis

Unless otherwise indicated, data were expressed as mean value \pm standard deviation ($n = 4$). Statistically significant differences between groups were assessed using unpaired, two-tailed, Student's t-tests. Statistically significant cytotoxicity of different groups was assessed using one-sample t-tests, with a threshold of 90%. Both tests were considered statistically significant at $p < 0.05$.

5.5 Results and Discussion

5.5.1 Effect of Buffer Type and Ionic Strength on Polyplexes

Previous work has shown that CS/DNA polyplex formulations, which have typical pH values of 4 to 5.5 in the absence of excipients, are subject to aggregation and pH shifts post freeze-drying, upon rehydration in the absence of buffers (Veilleux et al., 2016). Preliminary stability studies were therefore performed to identify buffers potentially compatible with polyplexes formed using ApoB-aODN (results not shown). Although final therapeutic particles are to be made with siRNAs, given their lower cost relative to siRNAs, ODNs were used as a potential mimic to assess the physicochemical properties of polyplexes during the initial phases of the optimization process. Buffers were selected based on their injectability and their pKa values being near physiological pH (see Supporting Information). Uncoated ($N/P = 2$ or 5) and HA-coated ($N/P/C = 2/1/1.5$) polyplexes were prepared in water; they were supplemented with buffers, to a final concentration of 10 mM and a pH of 6.5 or 7; and their size and PDI were measured immediately and after incubation for 2 h at room temperature. Initial results showed that uncoated polyplexes were stable in histidine, Tris-maleic acid, sodium phosphate, or maleic acid at pH 6.5, but were severely aggregated at $N/P = 5$ in the presence of Tris-HCl ($3,813 \pm 846$ nm). Tris-HCl having a pKa of 8.07, the target pH of 6.5 was outside the buffering range and impossible to obtain. Instead, formulations had final pH values of 6.83 ($N/P = 2$) and 6.93 ($N/P = 5$). Free CS having a

pK_{ap} of ~ 6.5 , and CS in polyplexes at $N/P = 5$ having a pK_{ap} of ~ 7.3 , partial deprotonation of CS at these pH may explain their aggregation or larger sizes (Filion et al., 2007; Richard et al., 2013). In fact, all uncoated polyplexes supplemented with buffers at pH 7 immediately aggregated. HA-coated polyplexes were stable in the presence of all buffers at pH 6.5, and all but maleic acid at pH 7, where size increased from 158 ± 18 nm to 514 ± 19 nm after 2h.

Since formulations undergo cryoconcentration during freeze-drying, and that they were designed to be concentrated upon rehydration, the effect of buffer concentration on polyplex size and PDI, consequently the ionic strength, was assessed. Uncoated ($N/P = 2$ or 5) and HA-coated ($N/P/C = 2/1/1.5$) polyplexes were formulated in histidine, Tris-maleic acid, sodium phosphate or maleic acid at pH 6.5, with buffer concentrations adjusted so that final ionic strengths varied from 1 to 42 mM (Table 5.2). In order to avoid nanoparticle dilution upon addition of excipients to samples, buffers were added to CS, ODN and HA prior to polyplex formation.

Table 5.2 Ionic strength of uncoated ($N/P = 2$ or 5) and HA-coated ($N/P/C = 2/1/1.5$) polyplexes formulated at pH 6.5 using different buffers and buffer concentrations

Buffer		Ionic Strength (mM)		
Name	Conc. (mM)	N/P = 2	HA-coated pH6.5	N/P = 5
Histidine (H)	2	1	1	2
	10	3	3	4
	40	11	11	12
	160	41	41	42
Tris- Maleic acid (TMA)	2	2	2	3
	10	9	9	10
	40	36	36	35
Sodium Phosphate (P)	2	4	4	5
	10	17	18	17
	24	41	41	41
Maleic acid (MA)	2	5	5	6
	10	24	24	25
	16	39	39	38

Polyplex size increased with increasing buffer concentration, and was linearly correlated to ionic strength for uncoated nanoparticle formulations (Figure 5.1). Increasing buffer ionic strength was associated with an increase in pH ranging from 0.10 to 0.30 depending on the buffer used and the polyplex N/P ratio. In fact, compositions were adjusted for samples containing 2 mM buffer, so

that, upon mixing with polyplexes previously prepared in HCl, their final pH = 6.5 ± 0.2 . To reach higher final ionic strengths, buffers were prepared at higher concentrations based on these adjusted compositions, without further adjustment of the pH. However, as buffer concentrations were increased, the effect on final pH of the HCl initially present with the polyplexes was reduced as it was getting buffered by the more basic, concentrated, buffer compositions. Polyplexes prepared at N/P = 2 were more susceptible to size increases upon increasing buffer concentration or ionic strength, especially in presence of maleic acid or sodium phosphate. Increasing ionic strength of these two buffers from 4-5 to 39-41 mM increased nanoparticle size by up to 6-fold, decreased ZP by 40%, and increased pH from ~ 6.72 to 6.93-7.02. Size of polyplexes prepared at N/P = 5 increased by no more than 2-fold when increasing formulation ionic strength; their ZP only slightly decreased in presence of maleic acid or phosphate while their pH increased by 0.2 to 0.4; and their PDI decreased by 3.25 to 4.4-fold. Finally, HA-coated polyplexes behaved similarly to uncoated particles at N/P = 2, which was expected since HA-coated particles were initially formed at N/P = 2 and incubated 10 min prior to adding HA (data not shown). The additional coating led to slightly larger anionic particles with zeta potentials varying between -25 and -40 mV, the lowest ZP values being obtained for polyplexes formulated at the highest maleic acid or phosphate concentrations, for which the pH was highest at 6.93 – 7.0.

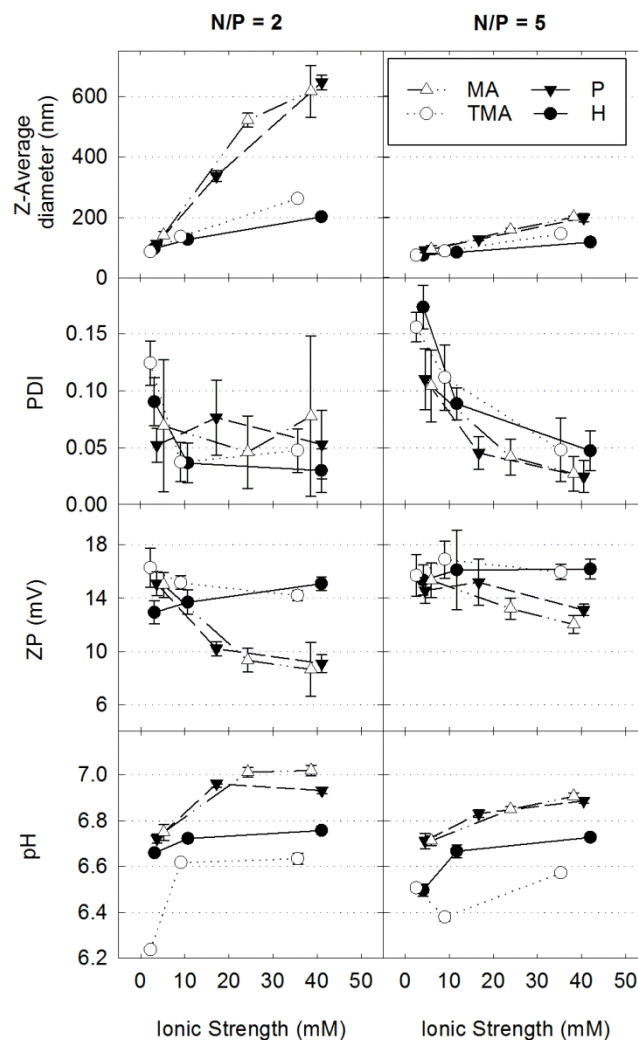


Figure 5.1 Effect of buffer type and ionic strength on CS/ApoB-aODN nanoparticle Z-average, PDI, ZP, and pH. Uncoated nanoparticles were prepared at N/P = 2 or N/P = 5 in different buffers (MA: maleic acid, P: sodium phosphate, TMA: Tris-maleic acid, H: histidine), to final ionic strengths of 2 to 40 mM. Sample pH were measured, then samples were diluted $\frac{1}{4}$ in water prior to DLS, and then further diluted $\frac{1}{2}$ with 20 mM NaCl prior to ZP analysis (final dilution of $\frac{1}{8}$ in 10 mM NaCl). Nanoparticles formed at N/P = 2 were larger than those formed at N/P = 5; their size increased by up to 6-fold when increasing maleic acid or sodium phosphate ionic strength from 4 to 41 mM, their ZP decreased by as much as 40 %, and their pH reached up to 7.0. Polyplexes formed at N/P = 5 were more stable for all buffers, despite the increase in ionic strength and pH: their sizes increased by no more than 2-fold, their PDI decreased by 3-fold, and their ZP remained constant. Mean \pm standard deviation (n = 4).

In order to further understand the mechanisms leading to polyplex increase in size or aggregation in presence of various buffers, uncoated nanoparticles were prepared at $N/P = 2$ or 5, in histidine or sodium phosphate at low and high ionic strengths, and were analyzed for their number average diameter, their concentration, and their free CS content. For polyplexes prepared at $N/P = 5$, increasing ionic strength from 2 to 41 mOsm with histidine, or from 5 to 42 mOsm with sodium phosphate, had no statistically significant impact on the particle number average diameter, concentration or free CS content (data not shown). On the contrary, samples prepared at $N/P = 2$ were significantly affected by the presence of high concentrations of histidine or sodium phosphate (Figure 5.2). Increasing the ionic strength of the samples from 1 to 41 mOsm with histidine led to a 71% increase in the number average diameter, a 24% decrease in polyplex concentration, and a 31% decrease in free CS content. In the presence of sodium phosphate, an increase in ionic strength from 4 to 41 mOsm was accompanied by a 2.33-fold increase in polyplex diameter and a 70% decrease in concentration, but with no significant change in free CS content.

These results suggest three buffer parameters affect the resulting CS/oligonucleotide polyplex formulations, namely the valency of their counterions, their ionic strength, and the resulting formulation pH. The synergistic effect of these properties had a greater impact on nanoparticles formed at $N/P = 2$. As previously discussed, increasing buffer concentrations led to increases in pH for all formulations. Those containing maleic acid or sodium phosphate being already relatively high at low ionic strength (pH = 6.75 and 6.72 respectively), this increase in pH had a greater impact on their polyplexes, as partial deprotonation of CS resulted in a drop of their ZPs and a large size increase. No more increase in pH was observed upon increasing the ionic strength of these formulations above ~ 20 mM, yet polyplex size further increased as a result of additional chitosan charge screening due to increasing dianionic counterion concentrations. In presence of histidine or Tris-maleic acid, formulation pH increased to no more than 6.76 with increasing ionic strength, therefore CS deprotonation was less severe and polyplexes were not aggregated. Although being more acidic, polyplexes prepared in Tris-maleic acid were slightly larger than those prepared in histidine, most likely due to the presence of maleic acid divalent counterions in the buffer. Polyplexes prepared at $N/P = 5$ in maleic acid or sodium phosphate had higher pH than those formed in histidine and Tris-maleic acid, which resulted in lower ZP. Compared to polyplexes prepared at $N/P = 2$, the decrease in ZP was not as important despite

similar pH between formulations. Furthermore, nanoparticle PDIs decreased drastically with increasing pH, while their sizes only slightly increased. The large excess free chitosan (60 - 70%) in these formulations may act to stabilize polyplexes in presence of buffers at higher ionic strength, preventing their aggregation while allowing them to adopt a more homogeneous suspension.

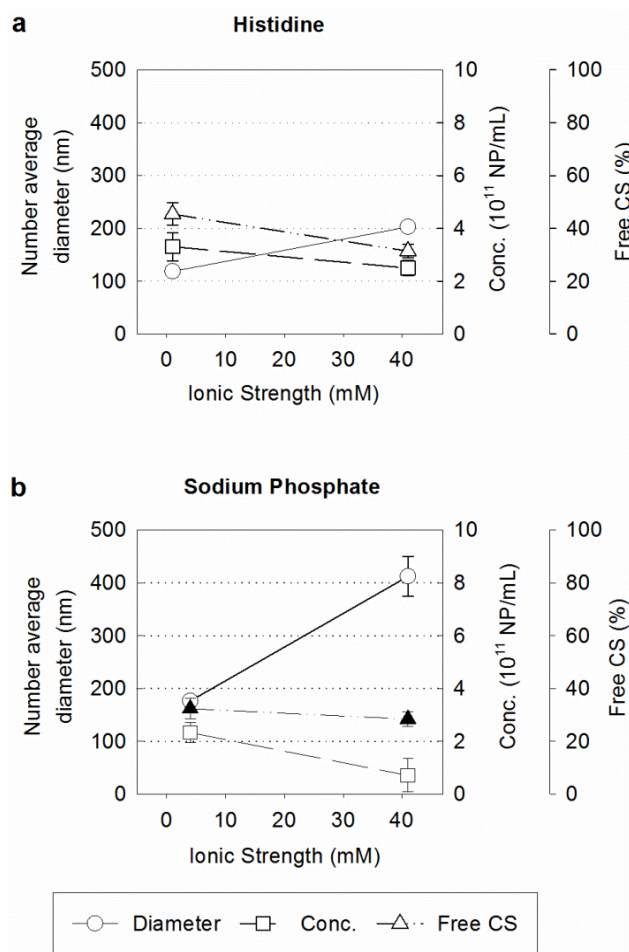


Figure 5.2 Effect of (a) histidine and (b) sodium phosphate ionic strengths on the number average diameter, the nanoparticle concentration, the percentage of free chitosan in CS/ApoB-aODN nanoparticle formulations prepared at $N/P = 2$. Increasing the histidine ionic strength from 1 to 41 mOsm, or the sodium phosphate ionic strength from 4 to 41 mOsm, caused an increase in particle size of 70 to 130% associated with a decrease in polyplex concentration of 25 to 70%. In the presence of histidine, the particle size increase was also associated with a decrease in free CS of about one third. Open symbols are used to show significantly different results between low and high ionic strengths ($p < 0.05$). Mean \pm standard deviation ($n = 4 - 10$).

5.5.2 Optimization of Buffer Concentration for Freeze-Drying

Efficiency of buffers to prevent nanoparticle aggregation during FD and maintain their pH upon rehydration was assessed using polyplexes formed with ApoB-aODN. Uncoated (N/P = 2 or 5) and HA-coated (N/P/C = 2/1/1.5) polyplexes were prepared in 0.5 % wt/vol trehalose and 2 mM histidine, Tris-maleic acid, sodium phosphate or maleic acid at pH 6.5. Buffer concentration was limited to no more than 2 mM based on previous results (Figure 5.1), considering freeze-dried formulations, therefore buffers, may be concentrated up to 20-fold upon rehydration. Polyplex Z-average and PDI were analysed prior to and after FD and rehydration to their initial concentration (Rh1X). As anticipated, uncoated polyplexes FD in maleic acid or sodium phosphate were aggregated (data not shown), most likely due to the combined effect of cryoconcentration during the freezing phase of the process and the divalent anionic nature of the buffers. Uncoated polyplexes prepared at N/P = 2 were also aggregated following FD in Tris-maleic acid (Figure 5.3a), whereas those prepared at N/P = 5 doubled in size but had a PDI < 0.20 (Figure 5.3b). Uncoated polyplexes Rh1X in 2 mM histidine showed statistically significant increases in size or PDI, yet remained within acceptable limits (Z-average \leq 129 nm, PDI \leq 0.13) (Figure 5.3a-b). Of the four buffers tested, only maleic acid caused aggregation of the HA-coated polyplexes following Rh1X at pH 6.5 (data not shown), perhaps due to crystallization in the solution during FD (Izutsu, K. et al., 2009). Statistically significant increases in Z-average were seen with other buffers, yet average sizes and PDIs were below 180 nm and 0.15 respectively (Figure 5.3c). Formulations at pH 6.5 containing histidine or Tris-maleic acid were further optimized by reducing the buffer concentration to 1 mM and rehydrating the sample at a concentration up to 20-fold higher (Rh20X) post FD (Figure 5.3a-c). Although none of the formulations were aggregated post FD (Z-average \leq 208; PDI \leq 0.20), most showed significant increases in Z-average while PDIs remained unchanged. Of these two buffers, histidine, which has the lowest ionic strength, yielded the best results with maximal increases in Z-average of 15% for uncoated polyplexes at N/P = 2, 36% for uncoated polyplexes at N/P = 5, and 50% for HA-coated polyplexes (Figure 5.3a-c).

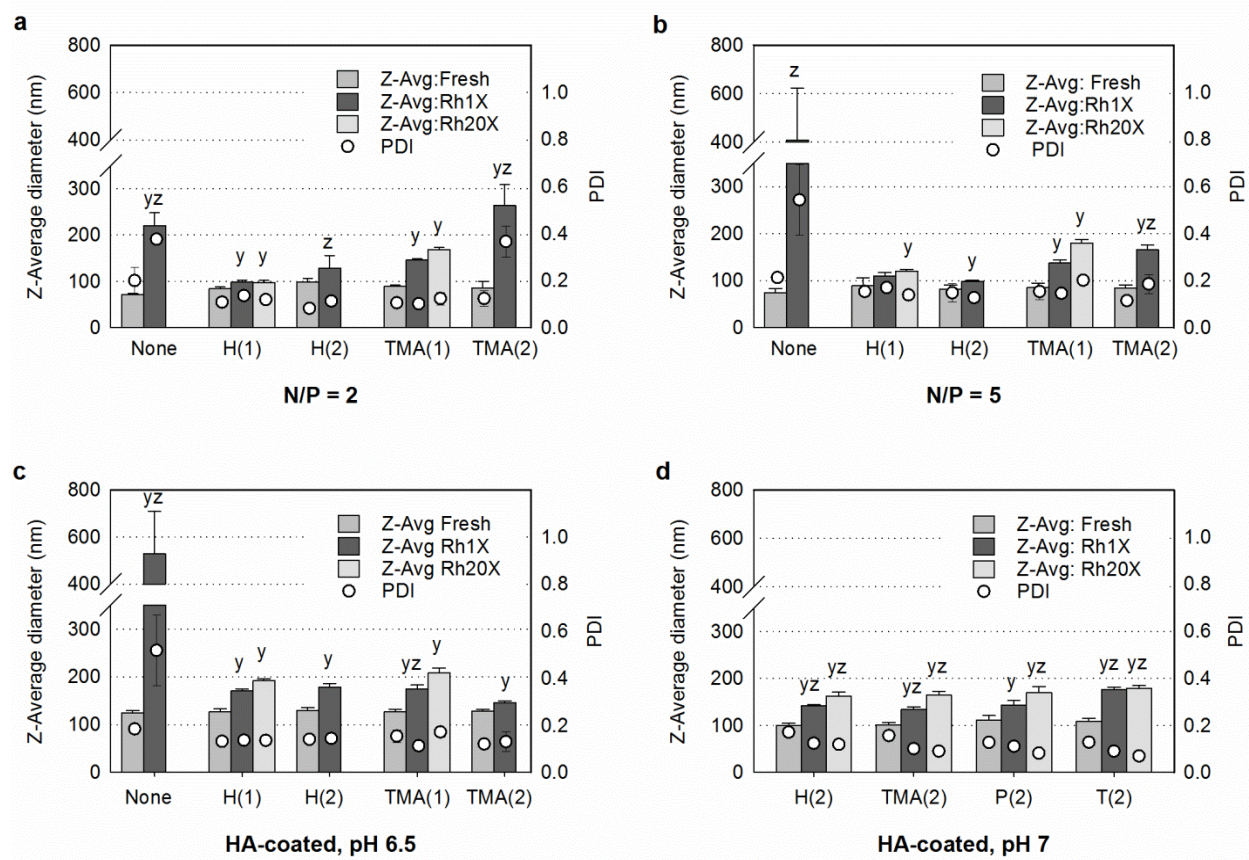


Figure 5.3 Optimization of buffer type and concentration for lyophilization and concentration of CS/ApoB-aODN nanoparticles. Z-average and PDI of uncoated polyplexes prepared at (a) N/P = 2 or (b) N/P = 5, and HA-coated (N/P/C = 2/1/1.5) polyplexes prepared at (c) pH 6.5 or (d) pH 7. Samples were formulated in 1 or 2 mM histidine (H), Tris-maleic acid (TMA), sodium phosphate (P), maleic acid (MA), or Tris-HCl (T), and were analyzed prior to (Fresh) and after freeze-drying and rehydration to initial (Rh1X) or 20 times the initial concentration (Rh20X). At pH 6.5, Histidine and Tris-maleic acid could be lowered to 1 mM without resulting in polyplex aggregation (Z-average ≤ 210 nm, PDI ≤ 0.2); optimal results were obtained with histidine. At pH 7, buffer concentrations could not be lower than 2 mM to main constant pH, but all buffers lead to similar polyplex Z-averages and PDIs, whether Fresh or Rh20X (Z-average ≤ 175 nm, PDI ≤ 0.15). Z-average (y) and/or PDI (z) of FD polyplexes were significantly different from those of fresh polyplexes of the same formulation. Mean \pm standard deviation ($n = 4$), ($p < 0.05$).

HA-coated polyplexes were then prepared and FD at pH 7 using histidine, Tris-maleic acid, sodium phosphate or Tris. In order to avoid precipitation of the intermediate uncoated polyplexes formed at N/P = 2, buffers were only added to HA prior to mixing, whereas 0.5 % wt/vol

trehalose was present in CS, ODN, and HA solutions. Samples were prepared in 1 mM buffer, but that concentration proved too low to maintain pH near 7 following rehydration (data not shown). Samples containing 2 mM buffer were therefore analyzed prior to FD and after Rh1X and Rh20X (Figure 5.3d, pH = 6.9 ± 0.1). Despite a statistically significant increase in Z-average for all samples, none of the formulations caused severe aggregation of the HA-coated polyplexes; their sizes increased by 59 to 64 % following Rh20X, reaching no more than 179 nm. For most samples, this increase in Z-average was accompanied by a statistically significant decrease in PDI of 30 to 46 %, with final values as low as 0.07. As discussed later, the increase in size and decrease in PDI observed at neutral pH post FD may be due to a reorganization of HA-coated particles during FD, where HA forms a corona around CS/ODN cores with lower charge densities.

5.5.3 Impact of Oligonucleotide Sequence on Freeze-Dried Polyplexes

Previous results showed that histidine was the most versatile buffer to FD polyplexes, whether they be uncoated (N/P = 2 or 5) or HA-coated (pH 6.5 or 7), and histidine was therefore chosen as buffer in the formulations henceforth. Previous work also showed that HA-coated polyplex size and PDI were directly influenced by that of the uncoated polyplexes from which they were produced, and that HA-coated nanoparticles were only marginally affected by FD. Therefore, influence of oligonucleotide parameters on the physicochemical properties of fresh, Rh1X and Rh20X polyplexes was assessed only for uncoated nanoparticles formulated in 0.5 % wt/vol trehalose and 1 mM histidine, at pH 6.5. The oligonucleotide parameters evaluated were the type of nucleic acid, whether ODN or siRNA, the choice of overhangs, whether blunt or sticky ends, and the target sequence, whether ApoB or eGFP, the latter richer in GC content.

Polyplexes targeting ApoB were prepared at N/P = 2 and 5 (Figure 5.4a, c), using ODN or siRNA with two different types of overhangs: asymmetrical 21-mer duplexes with a blunt end at the 3' end of the sense strand and a 2 nt overhang on the 3' end of the anti-sense strand (ApoB-aODN or ApoB-asiRNA); 21-mers with sticky ends of 4 nt on the 3' end of the anti-sense strand and 2 nt on the 3' end of the sense strand (ApoB-sODN or -ssiRNA). Polyplexes targeting eGFP were formed using either canonical (eGFP-ODN or eGFP-siRNA) or blunt (eGFP-bODN or eGFP-bsiRNA) 21-mer siRNA or ODN duplexes. Unlike polyplexes containing ApoB-siRNAs, those containing eGFP-siRNA or eGFP-bsiRNA could not be formed at N/P = 2 without observing

immediate macroscopic aggregation. Therefore, eGFP targeting polyplexes were prepared at $N/P = 2.5$ and $N/P = 5$ (Figure 5.4b, c). Most fresh polyplexes made with siRNA were significantly larger and had significantly higher PDIs than those made with ODN (data not shown at $N/P = 5$). At $N/P = 2$ or 2.5 , none of the CS/ODN formulations Rh20X were aggregated; their Z-average increased significantly, yet remained below 120 nm, and their PDIs remained unchanged. At those same N/P ratios, CS/siRNA polyplexes all significantly increased in size post Rh20X, with PDIs greater than 0.30 for all formulations except CS/ApoB-ssiRNA. Aggregation was most severe for CS/eGFP-b siRNA, with a Z-average of 664 nm and a PDI of 0.63. None of the CS/siRNA samples prepared at $N/P = 5$ were severely aggregated post Rh20X (Figure 5.4c), although CS/eGFP-b siRNA polyplexes were much larger and more heterogeneous (Z-average = 227 nm, PDI = 0.30).

According to these results, all three oligonucleotide parameters tested can have an effect on polyplex stability during FD. The most important parameter would seem to be the type of nucleic acid used in the polyplexes, with ODN forming complexes that are more uniform and stable during FD compared to siRNA. A sequence effect was also observed with polyplexes made from siRNA at low N/P ratio: unlike ApoB-siRNAs, GC-rich eGFP-siRNAs were unstable upon mixing with CS at $N/P = 2$, suggesting these sequence have a lower affinity to CS. Similar observations were previously published, where polyamines were found to bind stronger to AT-rich DNA sequences, compared to GC-rich sequences (Kabir & Suresh Kumar, 2013). This could explain the previous observations since the ApoB sequences used had an AT content of 61 %, compared to 45 – 48 % for the eGFP sequences. Finally, polyplexes formed at $NP = 2$ or 2.5 using siRNA seemed to be larger post FD when their siRNA sequence had at least one blunt end: CS/ApoB-asiRNA Rh20X were larger than CS/ApoB-siRNA Rh20X; CS/eGFP-b siRNA Rh20X were larger than CS/eGFP-siRNA Rh20X. In fact, the only CS/siRNA polyplexes at $N/P = 2$ that did not aggregate following Rh20X were those formed with ApoB-ssiRNA, the AT-rich sequence with overhangs of 2 and 4 nt on the 3' end of its sense and antisense strands respectively.

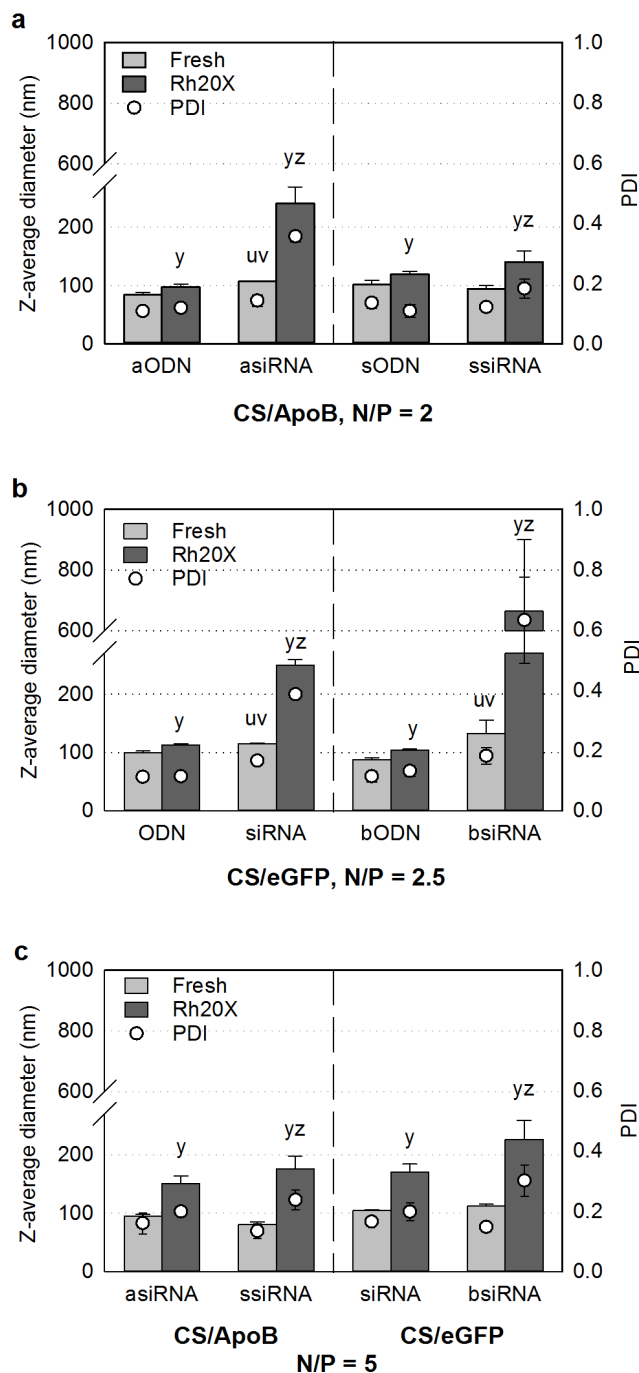


Figure 5.4 Effect of oligonucleotide type, overhangs, and sequence on the Z-average and PDI of fresh or freeze-dried nanoparticles. Polyplexes were formed at N/P = 2 or 2.5 using ODN and siRNA targeting for (a) ApoB (N/P = 2) or (b) eGFP (N/P = 2.5), or were formed at (c) N/P = 5 with siRNA targeting for ApoB or eGFP. Two types of overhangs were assessed for each sequence: a) ApoB asymmetrical (ApoB-aODN or -asiRNA) or with sticky ends of 4 nt on the 3'

end of the anti-sense strand and 2 nt on the 3' end of the sense strand (ApoB-sODN or -ssiRNA); eGFP canonical (eGFP-ODN or -siRNA) or blunt (eGFP-bODN or -bsiRNA). Polyplexes were prepared in 0.5 % wt/vol trehalose and 1 mM histidine, at pH \approx 6.5, and were analyzed prior to (Fresh) and after freeze-drying and rehydration to 20 times the initial concentration (Rh20X). With the exception of CS/ApoB-ssiRNA, all fresh CS/siRNA polyplexes formed at N/P = 2 or 2.5 were significantly larger than fresh CS/ODN nanoparticles, and were aggregated post Rh20X. Increasing the N/P ratio to 5 prevent polyplex aggregation (Z-average \leq 226 nm, PDI \leq 0.30). For a given sequence, Z-average (u) and/or PDI (v) of fresh polyplexes formed with siRNA were significantly different from those formed with ODN. Z-average (y) and/or PDI (z) of Rh20X polyplexes were significantly different from those of fresh polyplexes of the same formulation. Mean \pm standard deviation (n = 4), (p < 0.05).

The impact of the oligonucleotide parameters on the condensation efficiency of CS was then investigated using a Ribogreen exclusion assay. The fluorescence intensity of the dye, measured following incubation with polyplexes, is inversely proportional to the nucleic acid condensation efficiency of CS under the test conditions. Therefore, uncoated polyplexes were prepared at N/P ratios of 0 (free nucleic acid), 1, 2, and 2.5, using ODN and siRNA sequences previously discussed for ApoB and eGFP. Polyplexes were formulated in 0.5 % wt/vol trehalose and 1 mM histidine, using the buffer composition established for samples at N/P = 2. Independently of the oligonucleotide used, none of the polyplexes formed at N/P ratio of 2 or 2.5 showed any Ribogreen fluorescence, showing complete binding of the nucleic acids by CS (data not shown). At N/P = 1, CS binding was significantly lower for ApoB-asiRNA and eGFP-bsiRNA, compared to their ODN equivalents (Figure 5.5). In fact, for ApoB and eGFP, siRNAs were the oligonucleotides for which aggregation was the most important post Rh20X (Figure 5.4a, b). Both these oligonucleotide sequences also have at least one blunt end, suggesting this may affect polyplex formation and stability during FD. Although CS/eGFP-siRNA polyplexes seem to show higher average Ribogreen signal compared to CS/ApoB-siRNA polyplexes, little conclusion can be made from these results given the high variability (standard deviation) observed in the data. It is also important to keep in mind that most of these formulations are unstable or aggregated at such a low N/P ratio.

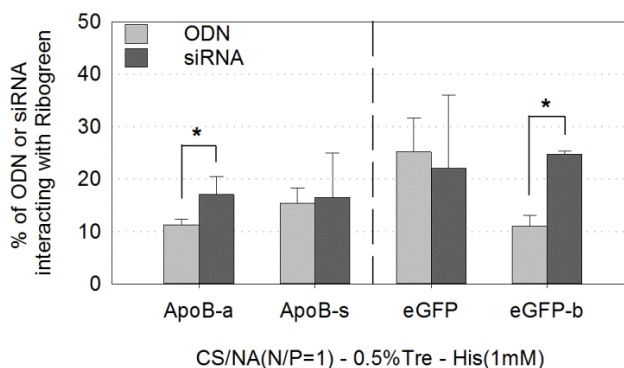


Figure 5.5 Effect of oligonucleotide type, overhangs, and sequence on the nucleic acid condensation efficiency of chitosan in presence of 0.5% wt/vol trehalose and 1 mM histidine at pH 6.5. CS/ODN and CS/siRNA polyplexes were formed at $N/P = 1$, using sequences targeting for ApoB or eGFP, each having two types of overhangs: ApoB asymmetrical (ApoB-a) or with sticky ends of 4 nt on the 3' end of the anti-sense strand and 2 nt on the 3' end of the sense strand (ApoB-s); eGFP canonical (eGFP) or blunt (eGFP-b). Freshly prepared polyplexes were incubated with RiboGreen and the resulting fluorescence was expressed as a percentage of the signal measured for nucleic acids in absence of CS. CS condensation efficiency was significantly lower for ApoB-asiRNA and eGFP-b siRNA, compared to their ODN equivalent. * Statistically significant difference ($p < 0.05$). Mean \pm standard deviation ($n = 4 - 10$).

Given the limitations of the data obtained with the Ribogreen assay at $N/P = 1$, the effects of oligonucleotide properties on polyplexes were further investigated for ApoB asymmetrical (ApoB-a) and eGFP blunt (eGFP-b) sequences using a titration approach. Polyplexes were prepared with ApoB-aODN, ApoB-asiRNA, eGFP-bODN, or eGFP-b siRNA, at N/P ratios ranging from 0.7 to 1.5, and the resulting Z-average and zeta potential curves were overlaid (Figure 5.6). In order to ensure full protonation of the amine groups of CS, and eliminate any excipient-related effects, CS and oligonucleotides were solely diluted in 10 mM acetic acid at pH 4.2 prior to nanoparticle formation. The N/P ratio at the isoelectric point (IEP, where $ZP = 0$ mV), as well as the minimal N/P ratio required to obtain non-aggregated ($Z\text{-avg} \leq 200$ nm) positively charged polyplexes, were compared. Polyplexes formed with ApoB-aODN and eGFP-bODN reached their IEP at N/P ratios of 0.82 and 0.87 respectively; those prepared with ApoB-asiRNA and eGFP-b siRNA reached their IEP at $N/P = 1.07$ and 1.15. Similarly, a minimum N/P ratio of 1.0 was required to obtain non-aggregated CS/ODN polyplexes, whereas N/P ratios of

1.2 and 1.3 were required for CS/ApoB-siRNA and CS/eGFP-biRNA respectively. In fact, an extra 20 to 30 % CS was required to stabilize CS/siRNA polyplexes compared to CS/ODN polyplexes, therefore supporting previous FD and nucleic acid condensation data (Figure 5.4 & Figure 5.5).

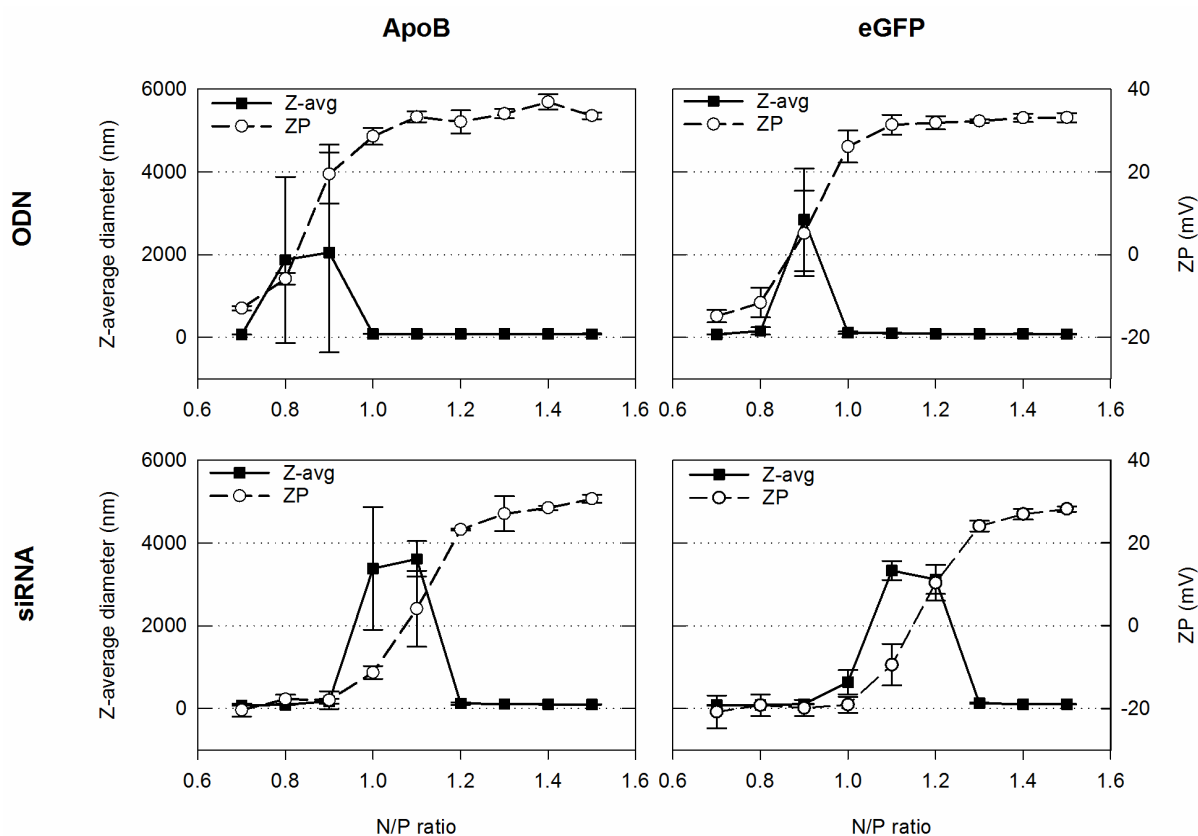


Figure 5.6 Identification of the isoelectric point (IEP) of various polyplexes by titration of ODN and siRNA, targeting for ApoB and eGFP, with CS. Samples were prepared in 10 mM acetate (pH 4.2), without excipients, at N/P ratios between 0.7 and 1.5, using asymmetrical ApoB (ApoB-aODN and ApoB-biRNA) and blunt eGFP (eGFP-bODN and eGFP-biRNA) oligonucleotides. Particle aggregation was observed at N/P ratios near the IEP ($ZP = 0$ mV). The IEP of polyplexes formed with ApoB-aODN and eGFP-bODN was at $N/P = 0.82$ and 0.87 respectively; the IEP of those formed with ApoB-biRNA and eGFP-biRNA was at $N/P = 1.07$ and 1.15 . Using eGFP sequences caused an increase of the IEP of 6 to 7.5% compared to the ApoB sequences, whereas using siRNAs instead of ODNs caused an increase of the IEP of 30 to 32%. Mean \pm standard deviation ($n = 4$).

It is important to mention that, although the computed molar extinction coefficient used to determine ODN and siRNA concentrations may be in error by 5% (Cavaluzzi & Borer, 2004), this is not sufficient to account for the 20-30% differences in CS required to fully bind siRNA vs ODN. In fact, these results are in accordance with previously published work that showed CS/siRNA polyplexes require higher N/P ratios than CS/DNA to be stable and efficient for gene delivery (Mao, S. et al., 2010). Similar results have recently been reported for polyethyleneimine (PEI) and cationic cyclodextrin polyrotaxanes, where polyplexes formed at N/P = 1 with siRNAs had zeta potentials ranging from -15 to -22 mV (Dandekar et al., 2015; Klauber et al., 2016). Also, although similar work has not been done yet for cationic polyelectrolytes, experiments and atomistic simulations have shown that short RNA duplexes (25 bp) are more resistant to condensation by trivalent cations than their ODN equivalents (Tolokh et al., 2014; Wu et al., 2015). In fact, previous work showed that ODN form electroneutral aggregates when 80 to 90% of their negative charges are compensated by bound counterions, which is also a requirement for DNA condensation (Bloomfield, 1997; Kornyshev & Leikin, 2013). Finally, as previously observed, more CS was required to ensure colloidal stability of CS/eGFP-bisRNA polyplexes, compared to CS/ApoB-bisRNA, which may be partly due to their respective AT content. Overall, these results suggest the choice or design of oligonucleotides must not solely be based on *in vivo* efficiency considerations, but also on their compatibility with the delivery vector used, as a sequence might be optimal with a carrier but not necessarily with another.

5.5.4 *In vitro* Silencing Efficiency and Biocompatibility of Polyplexes

Silencing efficiency and cytotoxicity of freshly prepared samples, as well as samples lyophilized and rehydrated to initial (Rh1X) or 20-fold the initial (Rh20X) concentration, was assessed *in vitro* on H1299 cells expressing eGFP (Figure 5.7). Since uncoated polyplexes prepared at N/P = 2 do not transfect well *in vitro* due to their low free CS content (Thibault, Marc et al., 2011), and that HA-coated polyplex knockdown efficiency was negligible on the eGFP⁺ H1299 cell line used (unpublished data), only uncoated CS/eGFP-siRNA polyplexes prepared at N/P = 5, with or without 0.5% wt/vol trehalose and 1 mM histidine at pH 6.5, were tested. In the absence of excipient, polyplex silencing efficiency decreased by half following FD, and further decreased when concentrating FD particles 20-fold upon rehydration. The loss of silencing efficiency is most likely attributed to severe aggregation of the polyplexes following FD in the absence of

excipient. As previously published for CS/DNA compositions (Veilleux et al., 2016), presence of trehalose and histidine had no significant impact on transfection efficiency or metabolic activity of freshly prepared polyplexes. In addition, polyplex FD and Rh1X or Rh20X with those excipients showed no significant variation of silencing efficiency, with levels ranging from 39 to 43% compared to untreated cells. As expected, DharmaFECT 2 and non-targeting siRNA controls had silencing efficiencies of 97 and 2% respectively. Whether freshly prepared or FD in presence or absence of excipient, none of the formulations caused H1299 cell metabolic activity to be significantly inferior to 90%, therefore none were cytotoxic.

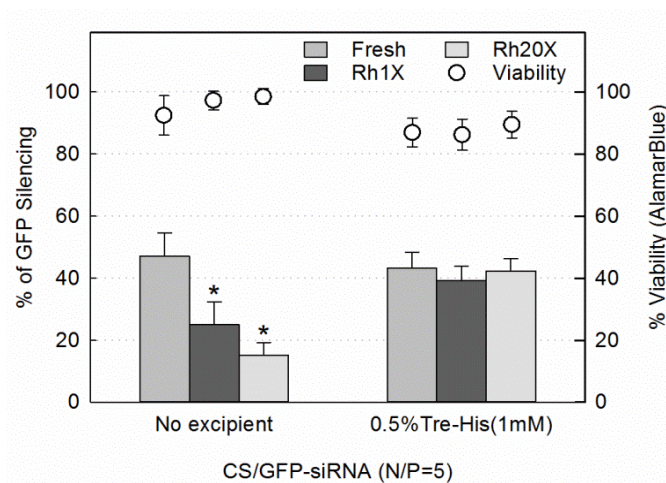


Figure 5.7 *In vitro* silencing efficiency and cytotoxicity of CS/eGFP-siRNA(N/P=5) prior to and after FD in presence or absence of 0.5% wt/vol trehalose and 1 mM histidine at pH 6.5. EGFP⁺ H1299 cells were transfected with 100 nM siRNA per well using polyplexes formulated with 0.5 % wt/vol trehalose and 1 mM histidine at pH6.5. Formulations were freshly prepared, or freeze-dried and rehydrated to initial (Rh1X) or to 20-fold the initial concentration (Rh20X). Cell viability, measured in terms of metabolic activity using AlamarBlue, was assessed 24h post transfection, whereas silencing efficiency was assessed 48h post transfection. Results are expressed as a percentage of eGFP silencing and viability relative to untreated cells. Excipients were necessary to preserve silencing efficiency of polyplexes after freeze-drying, with silencing efficiencies decreasing by nearly 3-fold following Rh20X without excipients. None of the formulations were cytotoxic at the concentrations tested; metabolic activity levels were not significantly lower than 90% ($p < 0.05$). *Silencing efficiency significantly different from fresh polyplexes of the same formulation ($p < 0.05$). Mean \pm standard deviation ($n = 6$).

Hemolysis and hemagglutination were then assessed for uncoated ($N/P = 2$ or 5) and HA-coated ($N/P/C = 2/1/1.5$) CS/ApoB-siRNA polyplexes formulated at pH 6.5 in 0.5 % wt/vol trehalose and 1 mM histidine, as well as for HA-coated polyplexes formulated at pH 7 in 0.5 % trehalose and 2 mM histidine. Samples were FD, Rh10X, and diluted serially diluted for the assay. CS 2 mg/mL and HA 1.26 mg/mL were included with the positive and negative controls respectively, which were tested at both pH 6.5 and 7.

As anticipated, trehalose, histidine, and HA caused no hemolysis or hemagglutination, whereas free CS was responsible for 20.6 to 22.8 % hemolysis and agglutination of red blood cells (Figure 5.8) (Carreño-Gómez & Duncan, 1997; Rao & Sharma, 1997; Shelma & Sharma, 2011). Uncoated polyplexes prepared at $N/P = 5$ exhibited a hemolytic dose response at the highest two concentrations, with levels reaching up 10 % hemolysis; those prepared at $N/P = 2$ caused no hemolysis. Knowing polyplexes prepared at $N/P = 5$ have about 70 % free CS, compared to approximately 30 % at $N/P = 2$ assuming a N/P ratio of 1.4 in the complexes (Ma, Pei Lian et al., 2010a; Richard et al., 2013), these results suggest that free CS present in the formulations would be responsible for most of the hemolysis observed. In fact, TEM images of these CS/ApoB-siRNA formulations, following FD and Rh20X, confirm the presence of free CS all around polyplexes prepared at $N/P = 5$ (Figure 5.9b), which is not the case of those prepared at $N/P = 2$ (Figure 5.9a). However, unlike nanoparticles at $N/P = 5$, those at $N/P = 2$ were aggregated following FD and Rh20X, so the surface area available to interact with and cause lysis of erythrocytes was greatly reduced. Despite these observations, both formulations caused hemagglutination (Figure 5.8b) due to the positive surface charge of their polyplexes (Rao & Sharma, 1997). Based on these results, uncoated CS/siRNA polyplexes would be limited to low doses for intravenous injection, although they could be used at higher doses for local delivery such as intramuscular, subcutaneous, intraarticular, etc. Use of formulations with limited free chitosan content may also be desirable to limit interactions with negatively charged biomolecules. However, CS/siRNA polyplexes formed at $N/P = 2$ have shown to be more prone to aggregation following FD, underlying the importance of carefully selecting the siRNA used in the formulations. It might also be possible to increase the stability of these polyplexes by using a higher M_n CS to increase the binding affinity between CS and siRNA, as seen with DNA (Lavertu, Marc et al., 2006; Ma, P. L. et al., 2009).

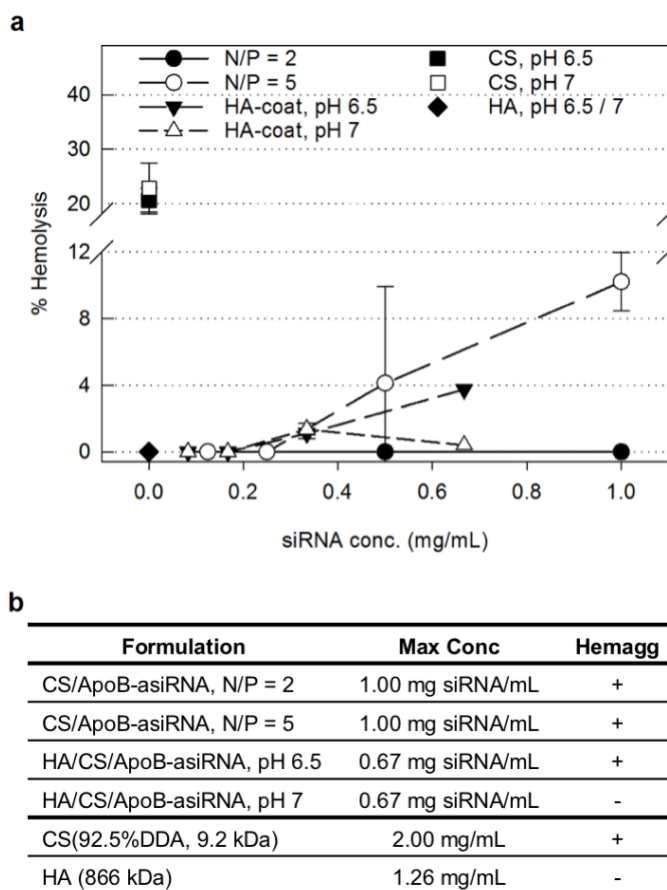


Figure 5.8 Hemolysis (a) and hemagglutination (b) of red blood cells following incubation with serial dilutions of uncoated ($N/P = 2$ or 5) and HA-coated ($pH 6.5$ or 7) CS/ApoB-siRNA nanoparticles. All formulations were prepared with 0.5% wt/vol trehalose; uncoated and HA-coated polyplexes at $pH 6.5$ were formulated with 1 mM histidine; and HA-coated polyplexes at $pH 7$ were formulated with 2 mM histidine. Samples were freeze-dried and rehydrated at 10 times their initial concentration (Rh10X), to a final siRNA concentration of 1 mg/mL for uncoated samples and 0.67 mg/mL for HA-coated sample, then were serially diluted by half three consecutive times. CS (2 mg/mL) and HA (1.26 mg/mL) were used as positive and negative controls respectively. Uncoated polyplexes at $N/P = 2$ and HA-coated polyplexes at $pH 7$ were nonhemolytic ($< 2\%$ hemolysis) for all the concentrations, whereas only the former did not cause hemagglutination. Mean \pm standard deviation ($n = 2$).

HA-coated polyplexes formulated at different pH modulated hemocompatibility profiles following Rh10X (Figure 5.8). In addition to causing hemagglutination, formulations at $pH 6.5$ produced 3.7% hemolysis at the highest concentration tested. On the contrary, formulations at

pH 7 did not promote hemagglutination or hemolysis. Based on TEM observations (Figure 5.9), this may suggest the HA coating may not be uniformly distributed on the nanoparticles following FD, therefore exposing CS to interact with erythrocytes. At pH 6.5, this exposed chitosan would be charged and could induce some hemolysis and hemagglutination, whereas at pH 7, it would be less protonated, consequently less hemotoxic. Although TEM images obtained for Rh20X HA-coated samples at pH 6.5 seem to present some asymmetry regarding their HA-coating, they also show the presence of what could be free CS and/or HA around the polyplexes (Figure 5.9c). If free positively charged CS strands were to be found in the formulation post FD, they could contribute to the hemotoxicity observed. TEM images of Rh20X HA-coated polyplexes at pH 7 revealed a different morphology: nanoparticles were larger, darker cores and lighter coronas (Figure 5.9d). These larger structures could result from the association of smaller HA-coated polyplexes which, at pH 7, would interact to shield any exposed hydrophobic CS within a hydrophilic HA corona.

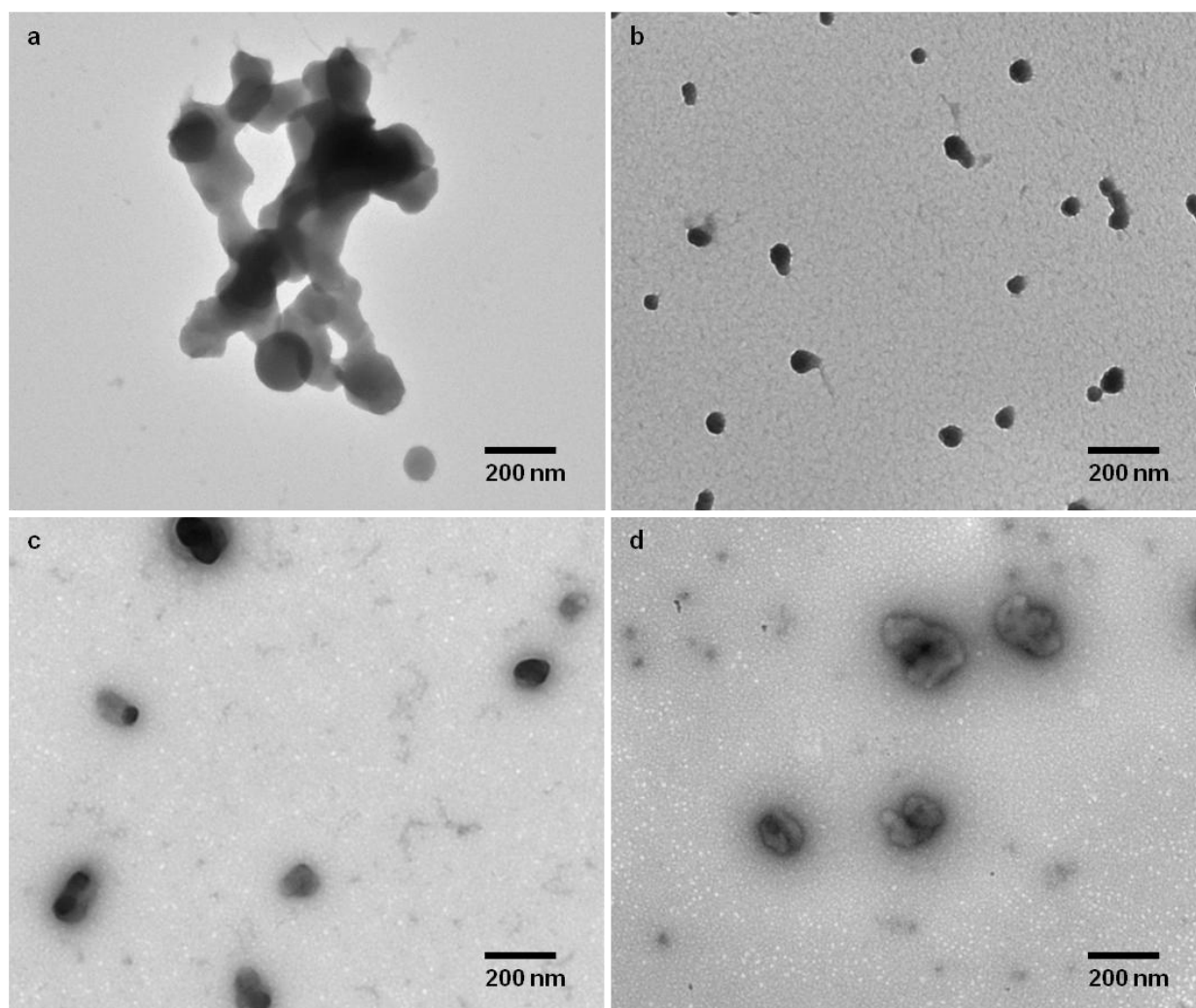


Figure 5.9 TEM images of uncoated ($N/P = 2$ or 5) and HA-coated ($\text{pH } 6.5$ or 7) polyplexes, formulated in 0.5% wt/vol trehalose and 1 or 2 mM histidine, after freeze-drying and rehydration to 20-fold the initial concentration (Rh20X): (a) CS/ApoB-siRNA($N/P=2$)- 0.5% Tre-His(1 mM)-Rh20X; (b) CS/ApoB-siRNA($N/P=5$)- 0.5% Tre-His(1 mM)-Rh20X; (c) HA/CS/ApoB-siRNA($N/P/C=2/1/1.5$)- 0.5% Tre-His(1 mM)- $\text{pH } 6.5$ -Rh20X; (d) HA/CS/ApoB-siRNA($N/P/C=2/1/1.5$)- 0.5% Tre-His(2 mM)- $\text{pH } 7$ -Rh20X. Uncoated polyplexes prepared at $N/P = 2$ were aggregated post Rh20X (a), whereas those prepared at $N/P = 5$, which appear to be surrounded by free CS, were small and spherical (b). HA-coated particles at $\text{pH } 6.5$ (c) are slightly larger than uncoated polyplexes in (b), due to the presence of HA, which forms what appears to be an uneven coating on the CS/siRNA particles. HA-coated polyplexes prepared at $\text{pH } 7$ (d) are larger than those at $\text{pH } 6.5$ (c); few small HA-coated polyplexes might interact to form larger particles with

dark hydrophobic cores, composed of CS with a lower charge density, surrounded by hydrophilic HA coronas.

5.6 Conclusion

Our study examined the impact of buffers, pH, oligonucleotide properties, and HA-coating on the physicochemical properties, silencing efficiency, and biocompatibility of CS/oligonucleotide polyplexes, prior to and after FD and rehydration to higher concentration. Increasing buffer concentration to final ionic strengths of up to 40 mM led to the formation of larger polyplexes, or to severe aggregation in the case of polyplexes formed at $N/P = 2$ supplemented with sodium phosphate or maleic acid. Size and PDI of uncoated polyplexes at lower N/P ratio were influenced by oligonucleotide properties, whether prior to or after FD in 0.5 % wt/vol trehalose and 1 mM histidine at pH 6.5. Nanoparticles formed with siRNA were less stable during FD than those formed with ODN; those containing GC-rich eGFP-siRNAs were more prone to aggregation than those containing AT-rich ApoB-siRNAs; and those formed with siRNAs containing at least one blunt end were more unstable during FD compared to those with siRNAs having overhangs at both ends. Nonetheless, FD CS/eGFP-siRNA polyplexes were non-cytotoxic and preserved their biological activity after Rh20X. As expected, reducing the N/P ratio of uncoated polyplexes, or coating them with HA, reduced their hemolytic potential. However, solely HA-coated formulations at pH ~7 completely eliminated hemagglutination and hemolysis. Future analysis of the effect of CS molecular weight on its binding affinity to siRNA could lead to the development of uncoated polyplex formulations at low N/P ratios with increased stability for FD. Finally, current HA-coated formulations show great potential for clinical intravenous delivery, and would benefit from further optimization of their coating, as well as evaluation of their *in vitro* and *in vivo* efficiencies.

5.7 Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

5.8 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant No. CRD PJ 445241 12), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, Innovation Polymères Consortium, and ANRis Pharmaceuticals Inc, of which K.B. is an employee.

5.9 Table of Contents Graphic

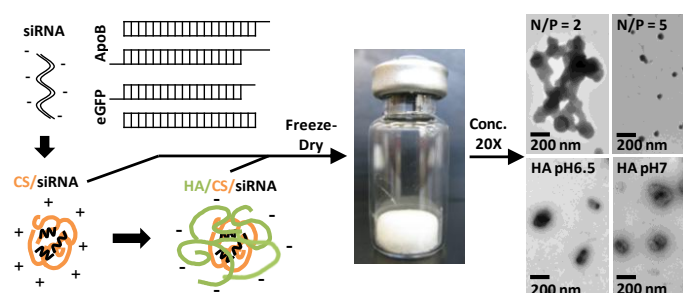


Figure 5.10 Table of contents graphic.

5.10 Supporting Information

Supporting information include details of ODN and siRNA including their sequences, GC content and coefficients of extinction, details of buffers including their structures, pKa and ionic composition at different pH, buffer compositions with polyplexes and calculation of formulation ionic strengths.

5.10.1 ODN and siRNA Sequences

ODNs and siRNAs sequences targeting ApoB or GFP consisted of 21 nucleotide (nt) sense strand and 21 or 23 nt antisense strands, resulting in various types of overhangs at both ends of the duplexes. Molar extinction coefficients used to determine siRNA concentration were provided by the supplier, those for ODN were found on the supplier website, using their *UV Spectrum of DNA*¹ web tool and applying the Cavaluzzi-Borer Correction (Cavaluzzi & Borer, 2004; Tataurov et al., 2008).

¹ IDT, UV Spectrum of DNA: <http://biophysics.idtdna.com/UVSpectrum.html>

- 1) ApoB-aODN and ApoB-asiRNA were asymmetrical, with a blunt end at the 3'-end of the sense strand and a 2 nt overhang at the 3'-end of the antisense strand. GC content: 39 %.

ApoB-aODN (347,918 L/mol·cm): sense 5'-GTCATCACACTGAATACCAAT-3', antisense 5'-ATTGGTATTCAGTGTGATGACAC-3';

ApoB-asiRNA (401,745 L/mol·cm), sequence from Zimmermann et al. (Zimmermann et al., 2006): sense 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAU-3', antisense 5'-A*UUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC-3'.

- 2) ApoB-sODN and ApoB-ssiRNA, were 21-mers with sticky ends of 4 nt on the 3' end of the anti-sense strand and 2 nt on the 3' end of the sense strand. GC content: 39 %.

ApoB-sODN (363,073 L/mol·cm): sense 5'-GTCATCACACTGAATACCAAT-3', antisense 5'-TGGTATTCAGTGTGATGACACTA -3'.

ApoB-siRNA(2a) (401,122 L/mol·cm): sense 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAU-3', antisense 5'-UGGUAUUCAGUGUGAUGACACU*A -3'.

- 3) eGFP-ODN and eGFP-siRNA were canonical (2 nt overhangs at the 3'-end of both strands) 21-mers. GC content: 55 %.

eGFP-ODN (335,292 L/mol·cm): sense 5'-GACGTAAACGGCCACAAGTTC-3', antisense 5'-ACTTGTGGCCGTTTACGTCGC-3'.

eGFP-siRNA (362,407 L/mol·cm), sequence from Howard et al. (Howard et al., 2006): sense 5'-GACGUAAACGGCCACAAGUUC-3', antisense 5'-ACUUGUGGCCGUUUACGUCGC-3'.

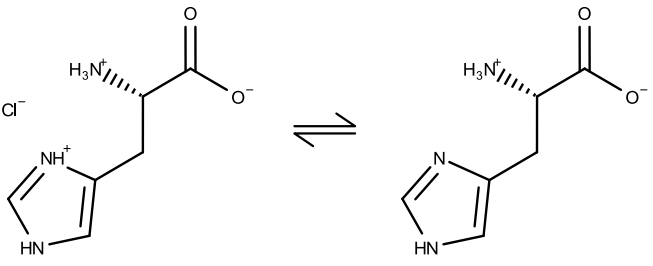
- 4) eGFP-bODN and eGFP-bsiRNA were blunt (no overhangs) 21-mers. GC content: 52 %.

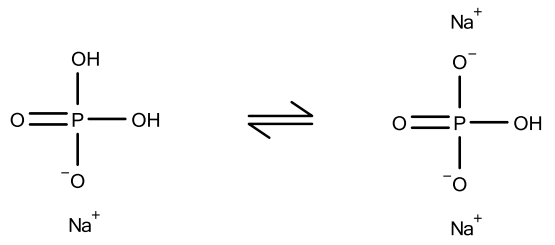
eGFP-bODN (331 815 L/mol·cm): sense 5'-GACGTAAACGGCCACAAGTTC-3', antisense 5'-GAAC TTGTGGCCGTTTACGTC-3'.

eGFP-bsiRNA (367 124 L/mol·cm): sense 5'-GACGUAAACGGCCACAAGUUC-3', antisense 5'-GAACUUGUGGCCGUUUACGUC-3'.

5.10.2 Buffer Properties and Compositions

Table 5.3 Buffers Structure, pKa, and Net Charge at Different pH

Histidine (H)			
pK_{a3} = 6.07			Net charge
Charge number (z)	+ 1	0	
Proportion at pH 6.5	27.1 %	72.9 %	+ 0.271
Proportion at pH 7	10.5 %	89.5 %	+ 0.105

Sodium Phosphate (P)			
pK_{a2} = 7.21			Net charge
Charge number (z)	- 1	-2	
Proportion at pH 6.5	83.68 %	16.32 %	- 1.16
Proportion at pH 7	61.86 %	38.14 %	- 1.38

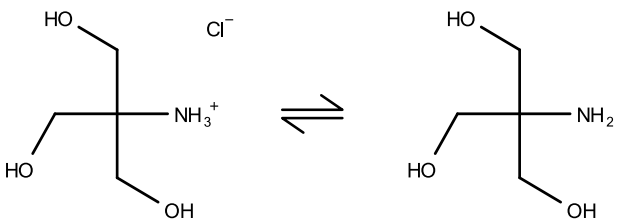
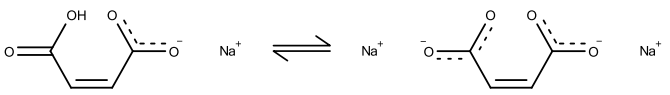
Tris			
pK_{a2} = 8.07			Net charge
Charge number (z)	+ 1	0	
Proportion at pH 6.5	97.4 %	2.6 %	+ 0.974
Proportion at pH 7	92.2 %	7.8 %	+ 0.922

Table 5.3 Buffers Structure, pKa, and Net Charge at Different pH (cont'd)

Maleic Acid (MA)			
pK_{a2} = 6.23			Net charge
Charge number (z)	- 1	-2	
Proportion at pH 6.5	34.9 %	65.1 %	- 1.65
Proportion at pH 7	14.5 %	85.5 %	- 1.86

Tris - Maleic Acid (TMA)	
<p>The net charge of the TMA buffer at pH 6.5 or 7 is calculated using the net charge of Tris and MA at each pH, multiplied by the molar ratio of Tris and MA in the buffer.</p> <p>Examples of calculations are provided here for 2 mM TMA buffers for HA-coated polyplexes at pH 6.5 and 7 (see buffer compositions in Table 5.4).</p>	
At pH 6.5: 1.34 Tris + 0.66 MA	$\text{Net Charge} = \frac{1.34}{2} (+0.974) + \frac{0.66}{2} (-1.65) = +0.108$
At pH 7: 1.4 Tris + 0.6 MA	$\text{Net Charge} = \frac{1.4}{2} (+0.922) + \frac{0.6}{2} (-1.86) = +0.087$

Relevant pKa values were found in the CRC Handbook of Chemistry and Physics (Lide, 2005). MarvinSketch² was used for drawing chemical structures.

² MarvinSketch, Marvin 16.4.4, 2016, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

Table 5.4 Buffer Compositions with Polyplexes

Type of polyplex	Name	Buffer						
		Final conc. (mM)	Composition					
			H (mM)	Tris (mM)	MA (mM)	NaH ₂ PO ₄ (mM)	HCl (mM)	NaOH (mM)
Uncoated, N/P = 2 or 2.5	Histidine (H) pH = 6.67 ± 0.09	1	1	0	0	0	0.1	0
		2	2	0	0	0	0.24	0
		10	10	0	0	0	2.5	0
		40	40	0	0	0	10	0
		160	160	0	0	0	40	0
	Tris-Maleic acid (TMA) pH = 6.6 ± 0.2	1	0	0.76	0.24	0	0	0
		2	0	1.27	0.73	0	0	0
		10	0	6.35	3.65	0	0	0
		40	0	25.4	14.6	0	0	0
	Sodium phosphate (P) pH = 6.9 ± 0.1	2	0	0	0	2	0	0.7
		10	0	0	0	10	0	3.5
		24	0	0	0	24	0	8.4
		40	0	0	0	40	0	14
	Maleic acid (MA) pH = 6.9 ± 0.1	2	0	0	2	0	0	3.39
		10	0	0	10	0	0	16.95
		16	0	0	16	0	0	27.1
		40	0	0	40	0	0	67.8
Uncoated, N/P = 5	Histidine (H) pH = 6.6 ± 0.2	1	1	0	0	0	0	0.7
		2	2	0	0	0	0	0.37
		10	10	0	0	0	2.5	0
		40	40	0	0	0	10	0
		160	160	0	0	0	40	0
	Tris-Maleic acid (TMA) pH = 6.49 ± 0.08	1	0	0.815	0.185	0	0	0
		2	0	1.63	0.37	0	0	0
		10	0	6.35	3.65	0	0	0
		40	0	25.4	14.6	0	0	0
	Sodium phosphate (P) pH = 6.82 ± 0.07	2	0	0	0	2	0	1.3
		10	0	0	0	10	0	3.5
		24	0	0	0	24	0	8.4
		40	0	0	0	40	0	14
	Maleic acid (MA) pH = 6.85 ± 0.09	2	0	0	2	0	0	4
		10	0	0	10	0	0	16.95
		16	0	0	16	0	0	27.1
		40	0	0	40	0	0	67.8

Table 5.4 Buffer Compositions with Polyplexes (cont'd)

Type of polyplex	Name	Final conc. (mM)	Buffer					
			Composition					
			H (mM)	Tris (mM)	MA (mM)	NaH ₂ PO ₄ (mM)	HCl (mM)	NaOH (mM)
HA-coated	Histidine (H) pH = 6.71 ± 0.07	1	1	0	0	0	0.15	0
		2	2	0	0	0	0.7	0
		10	10	0	0	0	2.5	0
		40	40	0	0	0	10	0
		160	160	0	0	0	40	0
	Tris-Maleic acid (TMA) pH = 6.63 ± 0.05	1	0	0.63	0.37	0	0	0
		2	0	1.34	0.66	0	0	0
		10	0	6.35	3.65	0	0	0
		40	0	25.4	14.4	0	0	0
	Sodium phosphate (P) pH = 6.92 ± 0.04	1	0	0	0	1	0	0.28
		2	0	0	0	2	0	0.6
		10	0	0	0	10	0	3.5
		24	0	0	0	24	0	8.4
		40	0	0	0	40	0	14
	Maleic acid (MA) pH = 6.99 ± 0.05	2	0	0	2	0	0	3.1
		10	0	0	10	0	0	16.95
		16	0	0	16	0	0	27.1
		40	0	0	40	0	0	67.8
HA-coated, pH 7.0 ± 0.2	H	2	2	0	0	0	0	0
	TMA	2	0	1.4	0.6	0	0	0
	P	2	0	0	0	2	0	0.92
	T	2	0	2	0	0	1.6	0

5.10.3 Calculation of Formulation Ionic Strengths

Total formulation ionic strength was obtained by adding polyplex and buffer ionic strength contributions.

5.10.3.1 Polyplex Contribution

Table 5.5 Calculation of the ionic strength contribution of polyplexes

	Chitosan solution						HA-coating				Ionic Strength (<i>I</i> , in mM) $I = 0.5 \sum_{i=1}^n c_i (z_i)^2$
Polyplex	CS		H ⁺		Cl ⁻		HA ⁻		Na ⁺		
	c (mM)	z	c (mM)	z	c (mM)	z	c (mM)	z	c (mM)	z	
N/P = 2	0.68	0	0.63	1	0.63	-1					0.63
N/P = 5	1.71		1.57		1.57						1.57
HA (2/1/1.5)	0.46		0.42		0.42		0.31	-1	0.31	1	0.73

5.10.3.2 Buffer Contribution

Ionic strength of buffers are calculated using histidine, Tris, maleic acid (MA), NaH₂PO₄, Na⁺ (from NaOH), and Cl⁻ (from HCl) molar contents (section 0), proportions and charge numbers of each buffer species at a given pH (section 5.10.2), and the ionic strength equation:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i (z_i)^2$$

Where c_i is the molar concentration of buffer species i at a given pH, and z_i is the charge number of that buffer species i . Three examples of calculations are provided:

1) CS/ODN (N/P = 2), in 10 mM TMA at pH 6.5:

10 mM TMA (pH6.5) = 6.35 Tris + 3.65 MA

$$\begin{aligned}
 I_{TMA} &= \frac{1}{2} \left[6.35 \cdot 0.974 \cdot (Tris^+)^2 + 3.65 \cdot \left(0.349 \cdot (MA^-)^2 + 0.651 \cdot (MA^{2-})^2 \right) \right] \\
 &= \frac{1}{2} \left[6.35 \cdot 0.974 \cdot (1)^2 + 3.65 \cdot \left(0.349 \cdot (-1)^2 + 0.651 \cdot (-2)^2 \right) \right] \\
 &= 8.48 \text{ mM}
 \end{aligned}$$

2) CS/ODN (N/P = 5), in 10 mM Histidine, at pH 6.5:

10 mM Histidine (pH 6.5) = 10 mM Histidine + 2.5 mM HCl

$$\begin{aligned} I_H &= \frac{1}{2} \left[10 \cdot 0.25 \cdot (His^+)^2 + 2.5 \cdot (Cl^-)^2 \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[10 \cdot 0.25 \cdot (+1)^2 + 2.5 \cdot (-1)^2 \right] \\ &= 2.5 \text{ mM} \end{aligned}$$

Note: The proportion of His^+ used in the calculations above was 0.25 instead of 0.27 since 2.5 mM HCl was used in the formulations instead of 2.7 mM.

3) HA/CS/ODN (N/P/C = 2/1/1.5), in 10 mM MA, at pH 6.5:

10 mM MA (pH6.5) = 10 mM MA + 16.95 mM NaOH

$$\begin{aligned} I_{MA} &= \frac{1}{2} \left[10 \cdot (0.349 \cdot (MA^-)^2 + 0.651 \cdot (MA^{2-})^2) + 16.95 \cdot (Na^+)^2 \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[10 \cdot (0.349 \cdot (-1)^2 + 0.651 \cdot (-2)^2) + 16.95 \cdot (1)^2 \right] \\ &= 23.2 \text{ mM} \end{aligned}$$

CHAPITRE 6 OPTIMISATION DES CYCLES DE LYOPHILISATION

6.1 Résumé

Des formulations lyophilisées de polyplexes de CS/ADN et CS/ARNic ont été développées pour la thérapie génique. Les cycles de lyophilisation utilisés pour obtenir ces compositions doivent toutefois être optimisés avant leur production en industrie. Les T_g' de diverses compositions ont été mesurées et comparées aux valeurs estimées à l'aide du modèle de Fox. La microstructure de lyophilisats, dont la formulation initiale contenait 0.5 ou 5% m/V lyoprotectant (sucrose, dextran 5 kDa, ou tréhalose), a été analysée. Finalement, les phases de congélation, de dessiccation primaire et de dessiccation secondaire ont été optimisées pour des échantillons contenant 0.5% m/V tréhalose. Les résultats ont démontré que les polyplexes avaient un effet négligeable sur la T_g' des formulations et que le modèle de Fox pouvait être utilisé pour estimer les T_g' avec une précision de $\pm 7\%$. Les formulations contenant 5% m/V dextran ou tréhalose favorisaient la formation de réseau poreux de feuillets; celles contenant 0.5% m/V lyoprotectant formaient de matrices fibreuses. Les échantillons dont la hauteur de remplissage atteignait 0.5 et 2 cm ont pu être lyophilisés en 25 et 62.5 h respectivement. La dessiccation était optimale à $T_s = -32\text{ °C}$ et $P_c = 60\text{ mTorr}$. Ces nouveaux cycles de lyophilisation accélérés sont très prometteurs pour des applications industrielles futures.

6.2 Introduction

Les travaux antérieurs réalisés au sein du groupe du professeur Buschmann ont permis de développer des systèmes à base de chitosane (CS) qui sont efficaces pour la livraison d'ADN et d'ARNic *in vitro* et *in vivo* (Alameh et al., 2012; Buschmann et al., 2013; Jean, M. et al., 2011; Jean, Myriam et al., 2012; Jean, M. et al., 2009; Lavertu, Marc et al., 2006; Thibault, M. et al., 2010). Les polyplexes en solution se sont toutefois révélés instables lorsqu'ils sont entreposés à une température supérieure à 4 °C , avec une augmentation de leur taille et une baisse de leur efficacité de transfection (Romøren et al., 2004). L'entreposage de formulations à des températures inférieures à la température ambiante présente toutefois des inconvénients techniques et financiers majeurs, spécifiquement lors du transport de ces produits (Anchordoquy, Thomas J. et al., 2001). La lyophilisation est un processus de déshydratation à basse température couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour stabiliser les formulations pour

l'entreposage à long terme à température ambiante. Nos travaux antérieurs ont démontré qu'il était possible de lyophiliser des complexes CS/ADN ou CS/ARNic dans des formulations contenant du tréhalose et de l'histidine, ce en préservant leurs propriétés physico-chimiques et leur activité biologique après réhydratation à des concentrations jusqu'à 20 fois plus élevées (Veilleux et al., soumis 13-07-2016; Veilleux et al., 2016).

La lyophilisation demeure toutefois un processus lent et énergivore qui peut devenir un goulot d'étranglement coûteux pour la production pharmaceutique s'il n'est pas optimisé (Petrides et al., 2011; Tang & Pikal, 2004). Il a été démontré qu'une augmentation de la température du produit de 1 °C réduisait le temps de dessiccation primaire, l'étape la plus longue du processus de lyophilisation, d'environ 13% (Pikal, M. J., 1990). La température d'affaissement (T_c) des formulations, soit la température au-delà de laquelle la structure macroscopique du produit est compromise pendant la lyophilisation, est donc le principal facteur limitant l'optimisation du processus. Puisque la mesure de la T_c est complexe et nécessite des équipements difficilement accessibles, la température de transition vitreuse des formulations cryoconcentrées (T_g'), qui se situe quelques degrés sous la T_c , est généralement utilisée pour optimiser les cycles de lyophilisation (Tang & Pikal, 2004). Bien que la T_g' puisse être mesurée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), le modèle de Fox s'est montré utile pour l'estimer pour certaines formulations lorsque les composantes du mélange ne cristallisent pas pendant la congélation (Österberg & Wadsten, 1999). Connaissant la T_g' , il est ensuite possible d'optimiser les cycles de lyophilisation selon les recommandations et le modèle de Tang et Pikal, lesquels reposent sur certains paramètres tels que la température cible du produit, la hauteur de remplissage des flacons, et la concentration en soluté (Tang & Pikal, 2004).

Le but des travaux réalisés dans ce chapitre était de déterminer l'impact des excipients et des polyplexes sur la T_g' des formulations, soit mesurée expérimentalement ou estimée à l'aide du modèle de Fox, puis d'optimiser le cycle de lyophilisation des formulations de polyplexes selon diverses hauteurs de remplissage des flacons. Ainsi, la T_g' des lyoprotectants, du tampon, du chitosane, et de formulations d'excipients avec ou sans polyplexes, a été mesurée, puis comparée aux valeurs estimées avec le modèle de Fox. L'impact du choix des lyoprotectants et de leurs concentrations initiales sur la microstructure des lyophilisats a été analysé par microscopie électronique à balayage. Le cycle de lyophilisation a ensuite été optimisé à l'aide de thermocouples placés dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur de 0.5 à 2 cm avec

diverses formulations contenant 0.5% m/V tréhalose. Le pourcentage d'humidité résiduelle, la T_g , et la stabilité à long terme des produits lyophilisés n'ont pu être analysés dans le cadre de cette étude, ils seront donc le sujet de travaux futurs.

6.3 Matériel et Méthodes

6.3.1 Matériel

Le CS a été obtenu de Marinard. L'oxyde de deutérium (no. 151882), le chlorure de deutérium 35 %m dans de l'oxyde de deutérium (no. 543047), l'hydroxyde de sodium (no. S5881), le nitrite de sodium (no. 431605), la solution normale (1N) d'acide chlorhydrique (no.318949), l'acide acétique glacial (no. 338826), l'azoture de sodium (no. S2002), l'acétate de sodium trihydraté (no. S7670), la solution normale (1N) d'hydroxyde de sodium (no. 319511), le sucrose (no. S0389), le tréhalose dihydrate (no. T0167), le L-histidine (no. H6034), et le chlorure de sodium (no. S6191) ont été obtenus de Sigma-Aldrich. Le dextran 5 kDa (no. 5510 0005 8006) a été obtenu de Pharmacosmos. Les flacons à sérum (no. 223683) et les joints en aluminium (no. 22418201) ont été obtenus de VWR. Les bouchons en butyle (no. 73828-13 et 73828A-21) ont été obtenus de Kimble Chase. La membrane Optitran BA-S 83 (no. 10439394) a été obtenue de Whatmann. Le plasmide EGFPLuc (no. 6169-1) a été obtenu de Clontech Laboratories. Le duplex ODN ciblant ApoB (ApoB-ODN) synthétisé par IDT Integrated DNA Technologies contenait le brin sens 5'-GTCATCACACTGAATACCAAT-3' et le brin anti-sens 5'-ATTGGTATTTCAGTGTGATGACAC-3'. Le duplex ARNic ciblant ApoB (ApoB-ARNic) synthétisé par Dharmacon (GE Healthcare) contenait le brin sens 5'-GUCAUCACA CUGAAUACCAAU-3' et le brin anti-sens 5'-AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACACU*A-3'.

6.3.2 Préparation des Formulations

Deux CS ont été utilisés pour optimiser le cycle de lyophilisation. Ils ont été désacétylés, dépolymérisés et caractérisés (^1H NMR et GPC) comme décrits antérieurement dans le Chapitre 4 (section 4.4.2) : leur DDA était 92.0 et 92.5%; leur Mn, 9.0 et 9.2 kDa; et leur PDI, 1.52 et 1.54. Les solutions mères de CS ont été préparées à 5 mg/mL, en dissolvant le CS séché pendant une nuit dans 28 mM HCl à température ambiante, avant d'être stérilisées par filtration. Le plasmide EGFPLuc a été préparé tel que décrit par Lavertu et al. (Lavertu, Marc et al., 2006). L'ODN et le

siRNA, qui sont reçus sous forme lyophilisée, ont été réhydratés à une concentration mère de 1 mg/mL à l'aide d'eau exempte de nucléase. La concentration des solutions mères de pEGFP_{Luc}, ApoB-ODN et ApoB-siRNA a été déterminée en mesurant leur absorbance à 260/280 nm par spectrophotométrie UV.

Les complexes CS/ADN ont été formés à un ratio N/P de 5 ($N/P = 5$), en mélangeant des volumes égaux de solutions de CS et de plasmide respectivement diluées à 271 et 100 µg/mL à l'aide d'eau Milli-Q et d'excipients. Les concentrations finales d'excipients établies dans l'article 1 (Chapitre 4) ont été utilisées, soit 0.5% m/V sucrose, dextran 5 kDa ou tréhalose, et 3.5 mM histidine à pH 6.5 (ratio molaire histidine : HCl = 4 : 1). Les mélanges ont été effectués manuellement dans des tubes coniques, en injectant rapidement le CS dans l'acide nucléique à l'aide d'une pipette, puis en abaissant et en relâchant rapidement le piston une dizaine de fois. Les complexes ont été entreposés à température ambiante 30 min avant utilisation, le temps qu'ils se stabilisent.

Les formulations contenant de l'ODN ou de l'ARNic, et ayant un pH final de 6.5, ont été formées avec des solutions de CS, d'acides nucléiques et de HA préalablement diluées avec de l'eau et des excipients exempts de RNase. Les complexes CS/ODN et CS/ARNic ont été formés de façon analogue aux complexes CS/ADN, c'est-à-dire en mélangeant des volumes égaux de solution de CS et d'acides nucléiques. Des tests préliminaires ayant démontré que ces complexes peuvent être formés à une concentration deux fois plus élevée que les complexes CS/ADN, les solutions mères d'ODN et d'ARNic ont été diluées à 200 µg/mL avant d'y mélanger le CS. La solution mère de CS a été diluée à 232 et 580 µg/mL pour former des complexes aux ratios N/P de 2 et 5 respectivement. Les complexes couverts de HA, soit HA/CS/ODN et HA/CS/ARNic, ont été formés à un ratio N/P/C de 2/1/1.5. La solution de HA, diluée à 390 µg/mL, a été mélangée aux complexes formés à $N/P = 2$ selon un ratio volumique HA : complexes de 1 : 2. La composition finale en excipient des formulations était de 0.5% m/V tréhalose et 1 mM histidine.

Des complexes HA/CS/ODN et HA/CS/ARNic ont été préparés à pH 7 en modifiant la procédure précédemment décrite pour les formulations à pH 6.5. Les complexes intermédiaires formés à $N/P = 2$ étant instables à pH 7, aucun tampon n'a été utilisé lors de leur formation. Le CS et l'oligonucléotide (ODN ou ARNic) ont été dilués à 232 et 200 µg/mL respectivement avec de l'eau et du tréhalose; le HA a été dilué à 390 µg/mL avec de l'eau, du tréhalose et de l'histidine.

Les complexes ont été préparés à N/P/C = 2/1/1.5, tel que décrit précédemment, mais à une concentration finale en excipients de 0.5% m/V tréhalose et 2 mM histidine. La composition finale des tampons histidine utilisés a été ajustée selon les formulations afin d'obtenir le pH désiré (Tableau 6.1).

Tableau 6.1 Tampons histidine pour les formulations CS/ODN et CS/ARNic.

Formulation	pH	Composition finale du tampon
N/P = 2	6.5	1 mM histidine + 0.1 mM HCl
N/P = 5	6.5	1 mM histidine + 0.7 mM NaOH
HA	6.5	1 mM histidine + 0.15 mM HCl
HA	7.0	2 mM histidine

La nomenclature employée pour désigner les diverses formulations utilisées dans ce chapitre est de la forme suivante :

HA/CS/NU(ratio N/P)-0.5%Lyo-His(XmM)-pHY-RhZX

- **HA/** : Préfixe ajouté pour les complexes couverts de HA.
- **NU** : « ADN », « ODN » ou « ARNic ».
- **ratio N/P** : « N/P = 2 » ou « N/P = 5 » (le ratio N/P/C n'est jamais indiqué pour les complexes couverts de HA, car il demeure toujours le même pour cette étude, soit 2/1/1.5).
- **LYO** : « Suc » pour sucrose; « Dex » pour dextran 5 kDa; et « Tre » pour tréhalose.
- **X** : « 1 », « 2 », ou « 3.5 », soit la concentration du tampon histidine, en mM.
- **Y** : « 6.5 » ou « 7 », soit le pH cible de la formulation (le pH n'est jamais indiqué pour les complexes sans HA, car ils sont toujours préparés à pH 6.5).
- **Z** : « 1 » ou « 20 », soit le facteur de concentration des formulations après réhydratation des lyophilisats (les suffixes *-Rh1X* et *-Rh20X* sont uniquement utilisés lorsqu'il s'agit de lyophilisats réhydratés).

6.3.3 Mesure de la T_g' par mDSC

La température de transition vitreuse des solutions cryoconcentrées (T_g') des excipients, du chitosane, et des diverses formulations de complexes a été mesurée à l'aide d'un calorimètre à balayage différentiel (DSC Q1000) équipé d'un système de refroidissement à l'azote liquide (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Des cellules hermétiques en aluminium ont été remplies avec 10 μL d'échantillon, ont été serties, puis ont été analysées à l'aide du mode modulé de l'appareil (mDSC). Une cellule vide préparée le jour même a été utilisée comme référence. Des tests préliminaires ayant démontré que la T_g' mesurée demeurerait la même indépendamment du taux de refroidissement utilisé, soit 1 ou 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, les échantillons et la référence ont été parallèlement soumis au cycle thermique suivant : 1) isotherme de 2 min à 25 $^{\circ}\text{C}$; 2) diminution de la température jusqu'à -70 $^{\circ}\text{C}$, à un taux de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 3) début de la modulation de la température de ± 0.23 $^{\circ}\text{C}$ chaque 60 s; 4) isotherme à -70 $^{\circ}\text{C}$ pendant 8 min; et 5) augmentation de la température jusqu'à 25 $^{\circ}\text{C}$ à un taux de 1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La fournaise était purgée avec de l'hélium à un taux de 25 mL/min pendant les analyses. Les formulations ont été analysées en duplicata. Le logiciel Universal V4.5A (TA Instruments) a été utilisé pour identifier la T_g' des formulations, soit le point médian de la transition vitreuse observée sur la courbe du flux de chaleur réversible en fonction de la température (Figure 6.1).

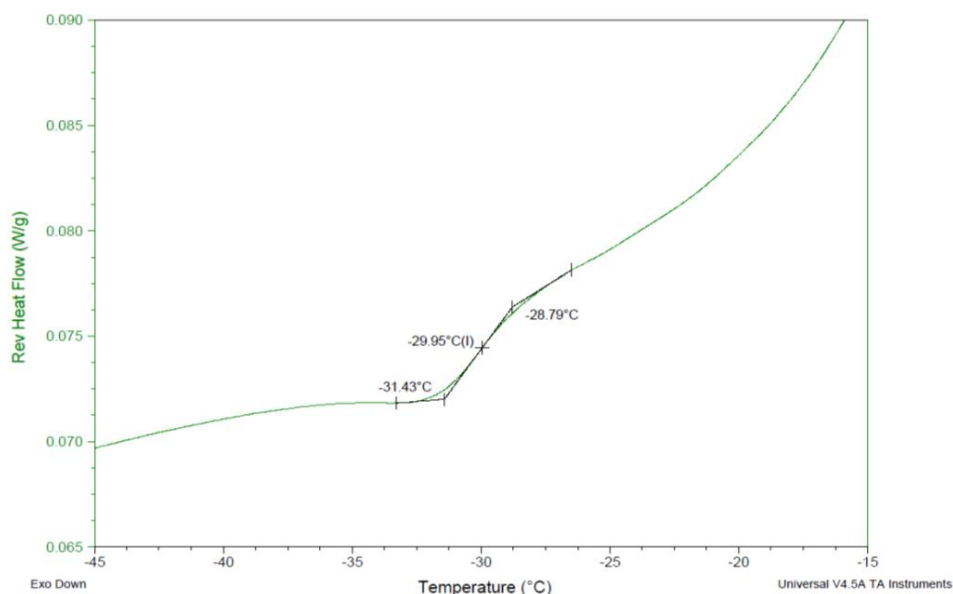


Figure 6.1 Identification de la T_g' d'un échantillon sur la courbe du flux de chaleur réversible exprimé en fonction de la température. La courbe obtenue par mDSC a été analysée à l'aide du

logiciel Universal V4.5A (TA Instruments). L'échantillon contenait 10% m/V tréhalose et 70 mM histidine (pH 6.5), et avait une T_g' de -29.95 °C.

Les T_g' des formulations de complexes ont été approximées à l'aide de l'équation de Fox (6.1), puis ont été comparées aux valeurs mesurées en mDSC pour déterminer la validité de ce modèle pour les formulations étudiées. Bien que l'équation ait été développée pour approximer la transition vitreuse (T_g) des mélanges, elle peut être utilisée pour évaluer leur T_g' en substituant T_g' à T_g dans l'équation de Fox (Österberg & Wadsten, 1999):

$$\frac{1}{T_{g12...n}} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}} + \dots + \frac{w_n}{T_{gn}} \quad (6.1)$$

Où $T_{g12...n}$ est la T_g du mélange; w_1 , w_2 et w_n sont les fractions massiques des composantes du mélange; et T_{g1} , T_{g2} et T_{gn} sont leurs T_g respectives.

6.3.4 Lyophilisation des Échantillons

Les échantillons ont été lyophilisés dans des flacons à sérum tubulaires de 10 mL, munis de bouchons de lyophilisation en chlorobutyle à 2 fentes de 20 mm. Divers volumes de formulation, correspondant à des hauteurs de remplissage (l_g) de 0.5 à 2 cm, ont été utilisés. Pour certains cycles de lyophilisation, les échantillons ont été couverts d'une membrane Optitran BA-S 83 (Whatmann) ayant des pores de 0.2 μ m afin de limiter les risques de contamination particulière ou bactérienne. Les cycles de lyophilisation ont été effectués dans un lyophilisateur de laboratoire commandé par ordinateur de la compagnie Millrock Technology (Laboratory Series Freeze-Dryer PC/PLC, Millrock Technology, Kingston, NY, USA). Des thermocouples ont été placés dans certains échantillons situés au centre de la tablette centrale de l'appareil pour analyser leur profil de température pendant les cycles. Les thermocouples ont été maintenus au centre des flacons, à 2-3 mm du fond, à l'aide de guides fixés aux bouchons de lyophilisation. Les 3 principales phases du cycle de lyophilisation, la congélation, le séchage primaire et le séchage secondaire, ont été optimisées selon les divers échantillons utilisés. Les échantillons lyophilisés ont ensuite été purgés à l'argon et les bouchons ont été abaissés dans les flacons à l'aide du mécanisme de bouchage du lyophilisateur. Finalement, les flacons ont ensuite été extraits du lyophilisateur, ils ont été immédiatement scellés à l'aide de joints en aluminium, puis ils ont été rangés à 4 °C pour usage ultérieur.

6.3.5 Analyse de la Congélation

L'effet de deux cycles de congélation sur diverses formulations et divers volumes de remplissage des flacons a été évalué à l'aide de thermocouples. L'analyse des profils de température a permis d'évaluer leur température de nucléation des échantillons, donc leur surfusion, et la croissance des cristaux (Figure 6.2) (Searles, J. A. et al., 2001). L'uniformité des profils de congélation des échantillons, selon le cycle de congélation et la hauteur de remplissage des flacons utilisés, a aussi été évaluée.

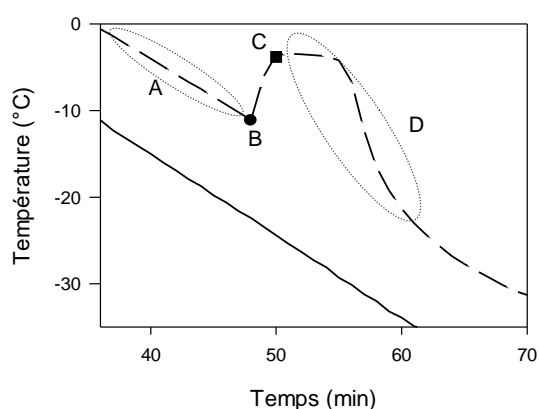


Figure 6.2 Exemple de profils de température de la tablette (—) et de l'échantillon (— —) pendant la congélation : (A) le refroidissement de l'échantillon avant la nucléation, (B) la température de nucléation, (C) la température ou le point de congélation, et (D) la période de croissance des cristaux. La surfusion est la différence de température entre B et C.

6.3.6 Modélisation des Paramètres de Dessiccation Primaire

L'optimisation de la phase de dessiccation primaire a nécessité : 1) l'identification de la température optimale du produit à l'interface de sublimation pendant la dessiccation primaire (T_p , en °C); 2) le calcul de la pression requise dans le lyophilisateur (P_c , en Torr); et 3) le calcul de la température de la tablette (T_s , en °C) pour atteindre T_p .

6.3.6.1 Estimation de la Température au Front de Sublimation et de la Pression de Dessiccation

Comme discuté précédemment, T_p ne doit pas excéder la température d'affaissement (T_c) de la formulation lors de la dessiccation. La T_c étant difficilement identifiable sans microscope à

lyophilisation, la T_g' des formulations, qui se mesure par mDSC, a été utilisée à titre de référence pour établir T_p . Cette approche est toutefois plus conservatrice puisque la T_g' est habituellement approximativement 2 °C inférieure à la T_c (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse, et al., 2006). Ainsi, la T_p a été fixée à 5 °C sous la T_g' des formulations, puis ajustée jusqu'à 2 °C sous la T_g' afin d'accélérer au maximum la dessiccation primaire sans causer l'affaissement des formulations lyophilisées. Connaissant T_p , la pression optimale de dessiccation primaire (P_c , en Torr) a été déterminée telle que (Tang & Pikal, 2004):

$$P_c = 0.29 \cdot 10^{(0.019 \cdot T_p)} \quad ; \quad 0.05 \leq P_c \leq 0.2 \quad (6.2)$$

6.3.6.2 Estimation de la Température de la Tablette

La température de la tablette (T_s) nécessaire pour obtenir T_p a été estimée selon la méthode décrite par Tang et Pikal (Tang & Pikal, 2004). Premièrement, le taux de sublimation de la glace ($\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{flacon}^{-1}$) a été estimé à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{dm}{dt} = \frac{1}{3600} \frac{P_{\text{glace}} - P_c}{R_p + R_s} \quad (6.3)$$

Où R_s , la résistance du bouchon au transport de la vapeur d'eau du front de sublimation au condensateur, est négligeable par rapport à R_p , la résistance de la couche sèche du produit au transport de la vapeur d'eau (Pikal, M. J. et al., 1984). N'ayant pas les ressources nécessaires pour mesurer R_p (en $\text{Torr} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$), elle a été estimée en fonction de la concentration en soluté des formulations selon (Pikal, M. J. et al., 1983; Tang & Pikal, 2004):

$$R_p = \frac{\hat{R}_p}{A_p}; \quad \begin{cases} \hat{R}_p = 5 & ; \text{concentration en soluté} > 10\% \\ \hat{R}_p = 1 & ; \text{concentration en soluté} < 1\% \end{cases} \quad (6.4)$$

Où \hat{R}_p est la résistance du produit normalisée par rapport à l'aire (en $\text{Torr} \cdot \text{h} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et A_p est l'aire (en cm^2) de la section transversale de la couche sèche, c'est-à-dire de l'intérieure du flacon (voir le Tableau 6.2). Finalement, P_{glace} , la pression de vapeur de la glace au front de sublimation (en Torr), a été calculée à l'aide de l'équation suivante (adaptée de (Jancso et al., 1970)) :

$$\log_{10} P_{\text{glace}} = -\frac{2668.726}{T_p + 273.15} + 10.43112 \quad (6.5)$$

Le taux de transfert de chaleur ($\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{flacon}^{-1}$) a ensuite été calculé selon (Tang & Pikal, 2004):

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \cdot \frac{dm}{dt} \quad (6.6)$$

Où ΔH_s , l'enthalpie de sublimation de la glace, est exprimée en fonction de T_p (en $^{\circ}\text{C}$) selon l'équation suivante (adaptée de (Feistel & Wagner, 2007)):

$$\Delta H_s = -4 \cdot 10^{-15} T_p^3 - 0.0009 T_p^2 - 0.0604 T_p + 677.02 \quad ; \quad -40 \leq T_p \leq -10 \quad (6.7)$$

Le coefficient de transfert thermique des flacons ($\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$) a ensuite été estimé tel que (Tang & Pikal, 2004):

$$K_v = KC + \frac{3.32 \cdot 10^{-3} \cdot P_c}{1 + KD \cdot P_c} \quad (6.8)$$

Où KC représente la somme des paramètres de transfert de chaleur par rayonnement et par conduction (en $\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$) et KD est un paramètre associé à la distance moyenne entre la tablette et la base du flacon (en Torr^{-1}). Les valeurs de KC et KD utilisées sont indiquées dans le Tableau 6.2.

Tableau 6.2 Propriétés des flacons de lyophilisation tubulaires de 10 mL de Wheaton

Symbole	Description	Valeur	Unités	Source
A_f	Aire de section transversale extérieure	4.41	cm^2	mesuré
A_p	Aire de section transversale intérieure	3.50	cm^2	mesuré
KC	Somme des paramètres de transfert de chaleur radiatif et par contact	2.64×10^{-4}	$\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$	(Pikal, Michael J., 1985)
KD	Paramètre associé à la distance moyenne entre la tablette et la base du flacon	3.64	Torr^{-1}	(Pikal, Michael J., 1985)

Finalement, les divers paramètres calculés précédemment ont été combinés dans la formule suivante pour déterminer la température de la tablette (T_s , en $^{\circ}\text{C}$) (Tang & Pikal, 2004):

$$T_s = T_p + \frac{1}{A_f} \cdot \frac{dQ}{dt} \cdot \left(\frac{1}{K_v} + \frac{l_g}{k_g} \right) \quad (6.9)$$

Où A_f est l'aire (en cm^2) de la section transversale extérieure du flacon (voir le Tableau 6.2), l_g est l'épaisseur de la couche de glace ou la hauteur de remplissage du flacon (en cm), et k_g est la conductivité thermique de la glace (en $\text{cal} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$) en fonction de T_p (adaptée de (Slack, 1980)):

$$k_g = -0.239 \cdot (0.0001T_p - 0.022) \quad ; \quad -40 \leq T_p \leq -10 \quad (6.10)$$

6.3.7 Optimisation des Phases de Dessiccation Primaire et Secondaire

La phase de dessiccation primaire a été optimisée en calculant T_s et P_c pour diverses conditions (concentration des excipients, T_p , l_g , etc.), et en évaluant la progression de la dessiccation primaire à l'aide des profils de température des échantillons. La fin de la dessiccation primaire est caractérisée par une augmentation soudaine de la température du produit lorsque la sublimation de la glace cesse, suivie d'un plateau (Tang & Pikal, 2004). La dessiccation secondaire a été effectuée en maintenant la pression égale à celle utilisée pour la dessiccation primaire, mais en augmentant graduellement T_s à 30°C , à un taux variant entre 0.1 et $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$, puis en maintenant isotherme à 30°C pour 6 h. La phase de dessiccation secondaire, ou désorption d'eau, a été jugée complète lorsque les profils de température des échantillons deviennent parallèles à celui de la tablette, ou lorsque la température des échantillons atteint un plateau 2 à 4°C sous la température finale de la tablette.

6.3.8 Imagerie des Lyophilisats par Microscopie Électronique à Balayage

La morphologie des produits lyophilisés a été observée par microscopie électronique à balayage (SEM) afin de caractériser leur porosité et détecter la présence de microaffaissement. Les flacons contenant les lyophilisats ont été équilibrés à température ambiante avant leur ouverture pour éviter toute condensation d'humidité sur les échantillons. Une fois les flacons ouverts, les échantillons ont rapidement été prélevés à l'aide d'une lame de rasoir, ils ont été fixés sur des surfaces adhésives de carbone, puis ils ont été pulvérisés d'or (Agar Manual Sputter Coater). Afin d'obtenir une meilleure résolution des microstructures, les observations ont été effectuées sous

vide poussé, à un voltage d'accélération de 20 kV, avec un diamètre du spot de 3 et une distance de travail d'environ 5 mm.

6.4 Résultats et Discussion

6.4.1 Température de Transition Vitreuse des Solutions Cryoconcentrées

Des analyses préliminaires effectuées sur des solutions d'excipients ayant une concentration égale à celle présente dans les échantillons avant la lyophilisation, notamment 0.5% m/V sucrose et 3.5 mM histidine, n'ont pas permis de détecter les T_g' des formulations, ce malgré la sensibilité de la mDSC. Les échantillons de sucrose, dextran, tréhalose et chitosane ont donc été analysés à une concentration de 2% m/V; ceux d'histidine pH 6.5, à une concentration de 140 mM. Bien que ces concentrations demeurent faibles compte tenu du faible volume d'échantillon contenu dans les cellules pendant l'analyse, la T_g' de chaque solution a pu être mesurée en duplicata. Les valeurs mesurées (moyenne \pm min/max) étaient en moyenne 0.5 à 3 °C inférieures à celles rapportées dans la littérature (voir Tableau 6.3).

Tableau 6.3 T_g' des excipients et du chitosane

Produit	$T_g' \pm \text{min/max}$ (°C)	T_g' Littérature (°C)	Référence
Sucrose	-34.1 ± 0.2	-32	(Taylor & Zografi, 1998)
Dextran 5kDa	-14.8 ± 0.2	-14.3	(Padilla et al., 2011)
Tréhalose	-32.0 ± 0.2	-29	(Taylor & Zografi, 1998)
L-histidine (pH 6.5)	-37.88 ± 0.03	-35	(Österberg & Wadsten, 1999)
Chitosane (10 kDa - 92% DDA)	-15.5 ± 1.3		S.O.

Afin d'évaluer l'impact des nanoparticules sur la T_g' des formulations, la T_g' de formulations concentrées de complexes a été mesurée et comparée à la T_g' de formulations ayant le même contenu en excipients. Les formulations de complexes CS/ADN (N/P=5) ont été préparées, lyophilisées et réhydratées à une concentration 20 fois plus élevée (Rh20X), comme décrit dans l'article 1 (Chapitre 4). Brièvement, la congélation des échantillons a été effectuée selon une rampe de température de 1 °C/min, de 20 à -40 °C, suivi d'une isotherme de 2h à -40 °C; la dessiccation primaire a été effectuée à -40 °C, à une pression de 100 mTorr, pendant 48 h; et la

dessiccation secondaire a été effectuée à pression constante (100 mTorr), en augmentant la température de la tablette jusqu'à 30 °C, à un taux de 0.1 °C/min, puis en la maintenant isotherme à 30 °C pour 6 h. Des formulations contenant une concentration équivalente d'excipients seulement, soit 10%Suc-His(70mM), 10%Dex-His(70mM), 10%Tre-His(70mM), ont été préparées et analysées en mDSC. Les T_g ' mesurées sont comparées dans la Figure 6.3 et les valeurs numériques (moyenne \pm min/max) sont présentées dans le Tableau 6.4. Comme anticipé, la concentration des nanoparticules étant très faible par rapport aux excipients, leur impact sur la T_g ' des formulations est très faible, soit une baisse de 0.37 à 1.21 °C selon le lyoprotectant utilisé dans la formulation.

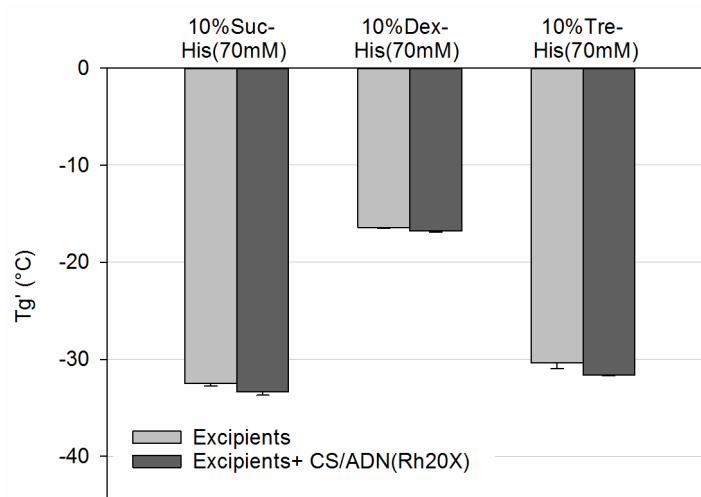


Figure 6.3 T_g' expérimentales des formulations avec ou sans complexes CS/ADN. La T_g' de formulations d'excipients contenant 10% m/V sucrose, dextran 5 kDa ou tréhalose et 70 mM histidine à pH 6.5 ont été mesurées et comparées à la T_g' de formulations de complexes CS/ADN ayant le même contenu en excipients. Les formulations de CS/ADN ont été préparées dans 0.5% m/V sucrose, dextran 5 kDa ou tréhalose et 3.5 mM histidine à pH 6.5, à une concentration de 50 μ g d'ADN/mL, elles ont été lyophilisées et réhydratées à une concentration 20 fois plus élevée, puis leur T_g' a été mesurée. La présence des complexes ne provoque qu'une baisse de la T_g' de 0.37 à 1.21 °C. Moyenne \pm min/max (n=2).

Les T_g' des formulations présentées dans la Figure 6.3 ont ensuite été estimées à l'aide de l'équation de Fox (6.1) et des T_g' des excipients et du chitosane préalablement mesurées (Tableau 6.3). Pour les formulations contenant des complexes CS/ADN, la T_g' des nanoparticules étant inconnue, seule la contribution du chitosane libre a été considérée dans les calculs. La portion de

chitosane libre a été estimée à 70% du contenu total en chitosane (Ma, Pei Lian et al., 2010a; Richard et al., 2013). Les valeurs calculées ($T_g'_{\text{Fox}}$) sont présentées dans le Tableau 6.4. Le modèle de Fox ne sous-estimait jamais les T_g' expérimentales de plus de 2.1 °C, et ne les surestimait jamais de plus de 1 °C. Les T_g' calculées étaient plus précises pour les formulations contenant des complexes, celle de la formulation contenant du tréhalose, soit CS/ADN(N/P=5)-0.5%Tre-His(3.5mM)-Rh20X, n'étant surestimée que de 0.31 °C.

Puisque le modèle de Fox estime adéquatement les T_g' des formulations, cela supporte l'hypothèse selon laquelle les excipients n'interagiraient pas entre eux pour former de nouveaux produits. En conséquence, les T_g' des formulations (Tableau 6.4) étaient très similaires à celles de leurs lyoprotectants (Tableau 6.3), ces derniers étant prédominants dans les formulations. En effet, les lyoprotectants représentent 87.2% du contenu massique des formulations, alors que l'histidine et le CS libre représentent 9.5% et 3.3% de leur contenu respectivement. Ainsi, pour des formulations ayant des ratios massiques d'excipients similaires, la T_g' du lyoprotectant serait une estimation acceptable de la T_g' des formulations. Dans le cas contraire, c'est-à-dire si plusieurs lyoprotectants ou agents de masse sont utilisés dans les formulations, il serait pertinent d'estimer leur T_g' à l'aide du modèle de Fox, à défaut de les mesurer expérimentalement.

Tableau 6.4 T_g' modélisées et expérimentales des formulations avec ou sans complexes CS/ADN

Formulation	$T_g'_{\text{Fox}}$ (°C)	$T_g'_{\text{exp}} \pm$ min/max (°C)	Écart modèle (°C)	(%)
10%Suc-His(70mM)	-34.5	-32.5 \pm 0.2	-2.0	-6.2
10%Dex-His(70mM)	-15.8	-16.43 \pm 0.06	0.63	3.8
10%Tre-His(70mM)	-32.5	-30.4 \pm 0.6	-2.1	-6.9
CS/ADN(N/P=5)-0.5%Suc-His(3.5mM)-Rh20X	-33.0	-33.4 \pm 0.3	0.4	1.2
CS/ADN(N/P=5)-0.5%Dex-His(3.5mM)-Rh20X	-15.8	-16.8 \pm 0.1	1.0	6.0
CS/ADN(N/P=5)-0.5%Tre-His(3.5mM)-Rh20X	-31.3	-31.61 \pm 0.08	0.31	1.0

6.4.2 Microstructure des Lyophilisats avant Optimisation du Cycle de Lyophilisation

L'impact de la formulation sur la microstructure des lyophilisats obtenus a été analysé par microscopie électronique à balayage (SEM). Les formulations optimisées dans le Chapitre 4 ont

été utilisées pour cette étude, et ont été comparées à des échantillons contenant 5% m/V sucrose, dextran 5 kDa, ou tréhalose, et 2 mg/mL chitosane. Des échantillons de 400 μ L ont été lyophilisés dans des flacons de 2 mL, soit une hauteur de remplissage de 3 mm, selon le cycle de lyophilisation décrit précédemment (Chapitre 4 et section 6.4.1). Ce cycle emploie en effet une température de la tablette largement sous la T_g mesurée pour ces formulations pour limiter l'affaissement du produit pendant la lyophilisation. Les images montrent que les lyophilisats obtenus pour les échantillons à concentration élevée en dextran ou tréhalose (Figure 6.4b, c) forment un réseau poreux de feuillets, alors que ceux obtenus pour les formulations contenant du sucrose ou ayant un faible contenu en excipients (Figure 6.4a, d à f) sont plus fibreux. Les microstructures observées pour les échantillons contenant 0.5% m/V sucrose, 5% m/V sucrose et 5% tréhalose sont très similaires à celles observées dans la littérature pour des formulations similaires (Al-Hussein & Gieseler, 2015; Izutsu, K.-i. et al., 2014; Schneid & Gieseler, 2008). Comme observé précédemment pour la T_g , le lyoprotectant, qui est largement excédentaire dans les formulations, semble dicter les propriétés des formulations, c'est-à-dire la microstructure de leur lyophilisat dans ce cas-ci. La concentration initiale de lyoprotectant a toutefois un impact important sur la microstructure des lyophilisats. En fait, des agents de masse sont généralement ajoutés aux formulations lorsque la concentration du principe actif est inférieure à 2% massique, ce dans le but d'améliorer les propriétés mécaniques et structurales du lyophilisat (McNally & Hastedt, 2008). Ullrich et al. a d'ailleurs observé une diminution importante de la rétraction (*shrinkage*) des lyophilisats avec l'augmentation de la concentration en sucrose ou en tréhalose (Ullrich et al., 2015b). Dans le cas présent, le microaffaissement n'affecte aucunement la réhydratation des lyophilisats et l'efficacité des complexes réhydratés, et est donc un compromis acceptable afin de pouvoir concentrer 20 fois la dose de polyplexes dans les compositions finales tout en assurant leur isotonicité (Chapitre 4).

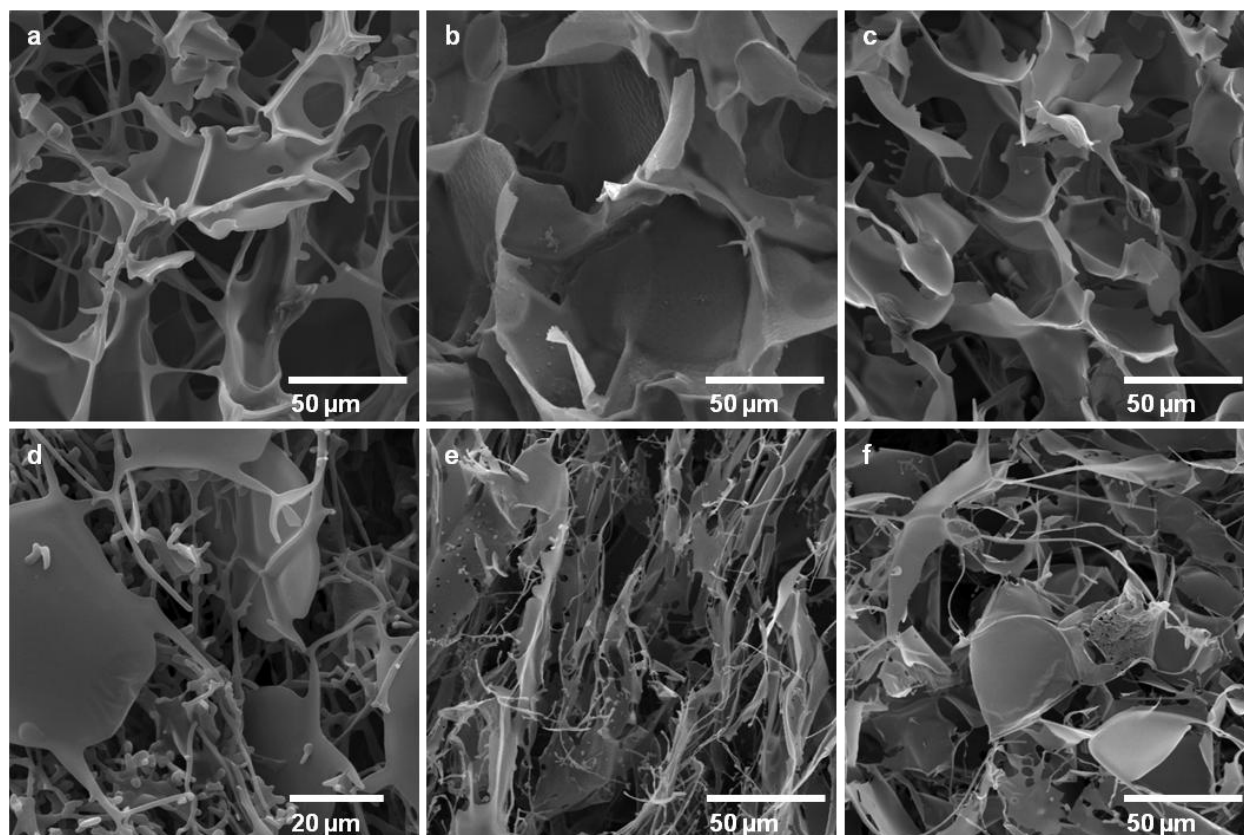


Figure 6.4 Impact du choix de la formulation, notamment la nature du lyoprotectant et la concentration des excipients, sur la microstructure des lyophilisats. Des échantillons lyophilisés contenant 2 mg/mL CS et 5% m/V sucrose (a), dextran 5kDa (b), ou tréhalose (c) ont été préparés et comparés à des échantillons de complexes CS/ADN ($N/P = 5$) lyophilisés dans 3.5 mM histidine (pH 6.5) et 0.5% m/V sucrose (d), dextran 5kDa (e), ou tréhalose (f). Les lyophilisats contenant initialement 5% m/V dextran ou tréhalose forment un réseau de feuillets dont la porosité est plus uniforme que ceux contenant du sucrose; les échantillons sont microaffectés et ont une microstructure plus filamenteuse lorsqu'ils sont lyophilisés à faible concentration en lyoprotectant.

6.4.3 Optimisation de la Congélation

Comme recommandé par Tang et Pikal (Tang & Pikal, 2004), la température finale de congélation des deux cycles testés a été établie à -40°C puisque la T_g' des formulations était supérieure à -38°C . Pour le premier cycle, une rampe de température modérée ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) devant minimiser la surfusion et la séparation de phase dans les échantillons a été évaluée (Tang & Pikal,

2004). Le second cycle de congélation, consistant en deux isothermes de 30 min, à 5 et -5 °C, suivis d'une rampe de température (1 °C/min) jusqu'à -40 °C, a été testé afin de déterminer si les isothermes favorisent une meilleure homogénéité de la cristallisation entre les échantillons (Tang & Pikal, 2004). Pour les deux cycles, la température finale de congélation (-40 °C) a été maintenue isotherme pendant 2 h pour assurer la congélation complète dans tous les échantillons, certains cycles contenant des flacons dont la hauteur de remplissage (l_g) excédait 1 cm (Tang & Pikal, 2004).

Dans un premier temps, l'effet des cycles de congélation a été évalué sur deux formulations de complexes préparés à pH 6.5, soit : 1) CS/ADN(N/P=5)-0.5%Tre-His(3.5mM) et 2) CS/ODN(N/P=5)-0.5%Tre-His(1mM). Ces formulations ont été congelées dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur l_g de 0.57 cm (2 mL/flacon). Comme anticipé, les profils de congélation étaient très similaires pour ces deux formulations, indépendamment du cycle de congélation utilisé (Figure 6.5a et b). En effet, bien que les concentrations d'histidine et de polyplexes diffèrent entre les formulations, l'impact était négligeable puisque leur contenu en tréhalose était le même. De plus, les températures moyennes de nucléation et de congélation, donc la surfusion moyenne, étaient similaires indépendamment de la présence d'isothermes pendant la congélation. Pour le premier cycle (Figure 6.5a), la température de nucléation était de -12.0 ± 0.9 °C, le point de congélation était -3.4 ± 0.3 °C, donc la surfusion était de -8.6 ± 1.2 °C; pour le second cycle (Figure 6.5b), la température de nucléation était de -10.5 ± 1.3 °C, le point de congélation était -3.5 ± 0.1 °C, et la surfusion était de -7.0 ± 1.4 °C (moyenne \pm min/max, n=2). La phase de congélation était prolongée d'environ 45 min par l'usage des isothermes, la température des échantillons atteignant T_s après ~2.5 h (b) au lieu de ~1.75 h (a). Bien que les résultats actuels n'aient pas permis d'identifier un avantage notable à l'ajout d'isothermes pendant la phase de congélation, Tang et Pikal mentionnent un gain potentiel en matière de reproductibilité intra- et inter-échantillon, et donc leur usage a été maintenu dans les cycles de lyophilisation subséquents (Tang & Pikal, 2004).

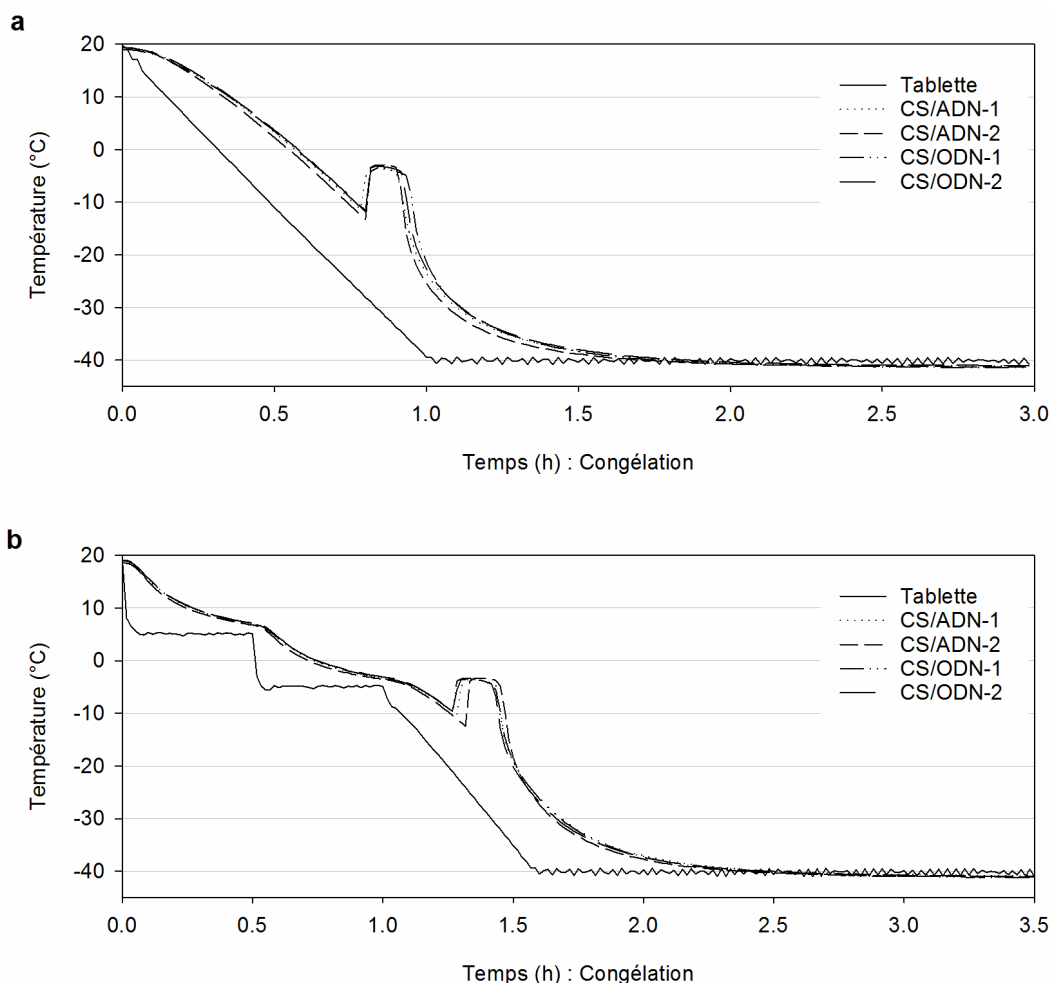


Figure 6.5 Profils de température de formulations de CS/ADN et CS/ODN soumis à deux cycles de congélation : a) une rampe de 1°C/min, de 20 à -40 °C, suivie d'une isotherme de 2h à -40 °C; b) deux isothermes de 30 min à 5 et à -5 °C, suivis d'une rampe de 1 °C/min jusqu'à -40 °C et d'une isotherme de 2 h à -40 °C. La phase de congélation a été effectuée sur 2 mL ($l_g = 0.57$ cm) de formulation dans des flacons de 10 mL. Les complexes CS/ADN et CS/ODN ont été préparés dans 0.5% m/V tréhalose et 3.5 ou 1 mM histidine respectivement, à pH 6.5, à des concentrations finales de 50 µg d'ADN/mL et 100 µg d'ODN/mL. Les températures de nucléation et de congélation, de même que la période de croissance des cristaux, étaient similaires entre les formulations et les cycles de congélation utilisés.

L'effet de la hauteur de remplissage des flacons sur la congélation d'échantillons de CS/ADN soumis au cycle de congélation ayant 2 isothermes a ensuite été évalué (Figure 6.6). Les complexes ont été préparés tel que décrit précédemment, soit dans 0.5% m/V tréhalose et 3.5 mM

histidine à pH 6.5, puis des flacons de lyophilisation de 10 mL ont été remplis à une hauteur de 0.57 ou 2 cm, correspondant à 2 ou 7 mL de formulation respectivement. Chaque hauteur de remplissage a été préparée en duplicata. Les échantillons remplis à 0.57 cm avaient une température de nucléation de -11 ± 2 °C, un point de congélation de -3.5 ± 0.2 °C, donc une surfusion de -7.8 ± 1.7 °C; ceux remplis à 2 cm avaient une température de nucléation de -10.8 ± 0.2 °C, un point de congélation de -1.0 ± 0.2 °C, donc une surfusion de -9.8 ± 0 °C (moyenne \pm min/max, n=2). Contrairement aux résultats publiés par Hottot et al. (Hottot et al., 2007), la surfusion observée était plus importante pour les échantillons ayant une hauteur de remplissage plus grande. Cette disparité pourrait s'expliquer par les différentes formulations analysées, ces derniers ayant utilisé des échantillons de 5% m/m BSA contenant 100 mM Tris-HCl. Schneid et Gieseler, qui ont étudié l'effet de la hauteur de remplissage sur la congélation de solutions de 5% m/m sucrose, ont quant à eux obtenu des résultats similaires à ceux présentés à la Figure 6.6, soit une légère augmentation de la surfusion et une importante augmentation de la période de croissance des cristaux lorsque les flacons sont remplis à 2 cm au lieu de 0.5 cm (Schneid & Gieseler, 2008). Ce phénomène pourrait être dû à l'accumulation de l'énergie latente de cristallisation dans l'échantillon plus volumineux, le transfert de chaleur étant limité par l'aire surfacique de la base du flacon en contact avec la tablette (Hottot et al., 2007; Schneid & Gieseler, 2008).

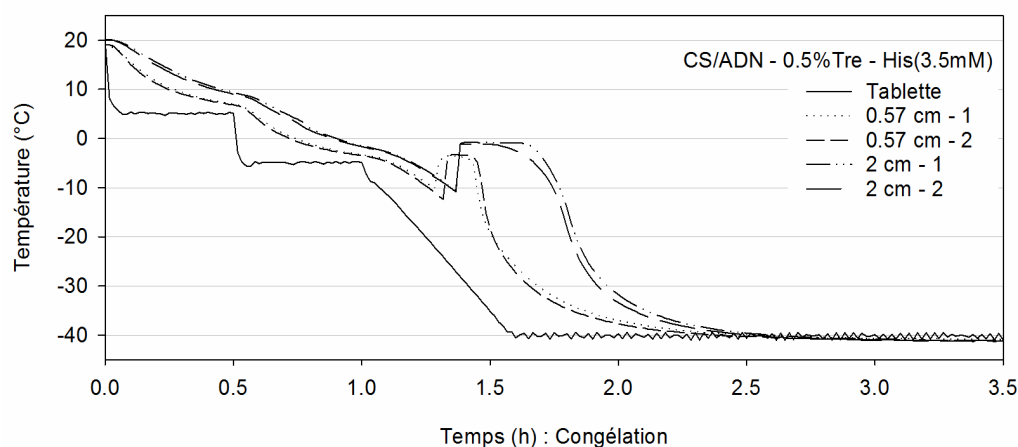


Figure 6.6 Effet de la hauteur de remplissage de flacons de 10 mL sur le profil de température lors de la congélation de formulations de CS/ADN. Les polyplexes ont été préparés dans 0.5% m/V tréhalose et 3.5 mM histidine à pH 6.5, à une concentration de 50 µg d'ADN/mL. Des échantillons ayant une hauteur de remplissage (l_g) de 0.57 ou 2 cm ont été soumis à un cycle de

congélation débutant par deux isothermes de 30 min, soit à 5 et à -5 °C, suivis d'une rampe de 1 °C/min jusqu'à -40 °C et d'une isotherme de 2 h à -40 °C. La température de congélation était plus élevée pour les échantillons remplis à 2 cm, soit -1°C au lieu de -3.5 °C pour ceux remplis à 0.57 cm, et la croissance des cristaux était plus lente. La congélation était complète après 2.5 h pour tous les échantillons ($T \approx T_s$).

6.4.4 Optimisation de la Phase de Dessiccation

Divers paramètres ont été modifiés au cours du processus d'optimisation de la dessiccation: les formulations, les hauteurs de remplissage des flacons, la température de la tablette, la pression de la chambre du lyophilisateur, etc. La phase de congélation est toutefois demeurée constante, les échantillons étant congelés selon le cycle possédant 2 isothermes de 30 min à 5 et -5 °C, suivis d'une rampe de 1 °C/min jusqu'à -40 °C et d'une isotherme de 2 h à -40 °C (Figure 6.5b).

6.4.4.1 Phase de Dessiccation Primaire Non Optimisée

Le cycle de dessiccation primaire non optimisé a été déterminé avant de connaître la T_g' des formulations. Ainsi, la température de la tablette (T_s) et la pression dans la chambre (P_c) ont été choisies de façon arbitraire, en fonction de la littérature. Afin de s'assurer que la température du produit n'excède pas la T_c des formulations, donc que les produits ne soient pas affaissés, T_s a été fixée à -40 °C, soit 5 °C sous la T_g' la plus faible rapportée dans la littérature pour les excipients présents dans les formulations (L-histidine, Tableau 6.3). Cette valeur est très conservatrice pour 4 raisons : 1) L-histidine est minoritaire dans les formulations, donc la T_g' finale des formulations devrait être supérieure à -35 °C; 2) T_s a été établie en soustrayant 5 °C à la T_g' , ce qui représente une grande marge de sécurité pour évaluer la température de lyophilisation; 3) T_g' est habituellement quelques degrés sous la température d'affaissement (T_c); et 4) la température de l'échantillon est typiquement au moins 5 °C sous T_s pendant la dessiccation (Tang & Pikal, 2004). P_c a été fixée à une valeur intermédiaire entre 50 et 200 mTorr, soit 100 mTorr, pour favoriser un transfert de chaleur homogène entre les flacons pendant la dessiccation (Pikal, M. J. et al., 1984). T_s et P_c ont été maintenues constantes pour la durée totale de la phase de dessiccation primaire, soit 24 h.

Cinq formulations ont été lyophilisées dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur de 0.57 cm. Les profils de température de deux formulations, CS/ADN(N/P=5)-0.5% Tre-His(3.5mM) et

CS/ODN(N/P=5)-0.5%Tre-His(1mM), ont été obtenus pendant la dessiccation primaire (Figure 6.7a) et secondaire (Figure 6.7b). Les lyophilisats obtenus pour ces deux formulations, de même que pour des échantillons de CS/ODN(N/P=2)-0.5%Tre-His(1mM), HA/CS/ODN-0.5%Tre-His(1mM)-pH6.5 et HA/CS/ODN-0.5%Tre-His(2mM)-pH7, ont été photodocumentés (Figure 6.7c à g). La dessiccation primaire des échantillons de CS/ODN était plus rapide et uniforme entre les duplicatas que celle des échantillons de CS/ADN (Figure 6.7a): la sublimation de l'eau s'est produite après 9 à 11 h de dessiccation pour les échantillons de CS/ODN; elle s'est produite après 12 à 16 h pour les échantillons de CS/ADN. La dessiccation secondaire était très similaire entre les deux formulations, avec une perte d'eau notable après ~ 29 - 30 h (Figure 6.7b), suivie d'une stabilisation des profils de température des échantillons qui deviennent parallèles à celui de la tablette ($T_s - T_p = \text{constante}$).

Tous les échantillons ont produit des lyophilisats blancs affichant une légère rétraction radiale (*shrinking*) et quelques fissures (Figure 6.7c à g). Les fissures étaient davantage prononcées lorsqu'une partie du solide demeurait fixée à la paroi interne du flacon pendant la lyophilisation, habituellement la couche supérieure du lyophilisat (Figure 6.7f). Cette couche supérieure d'apparence vitreuse serait vraisemblablement composée de soluté amorphe concentré et d'eau absorbée (Pikal, M. J. et al., 1983). Pendant la dessiccation, la rétraction permet la relaxation des contraintes dans le produit; or s'il adhère à la paroi du flacon, les contraintes s'accumulent jusqu'à la rupture du lyophilisat (Ullrich et al., 2015a, 2015b). Ullrich et al. ont en effet observé une relation inverse entre la rétraction des lyophilisats de tréhalose et leur fissuration, la rétraction augmentant avec la réduction du contenu en tréhalose (Ullrich et al., 2015b).

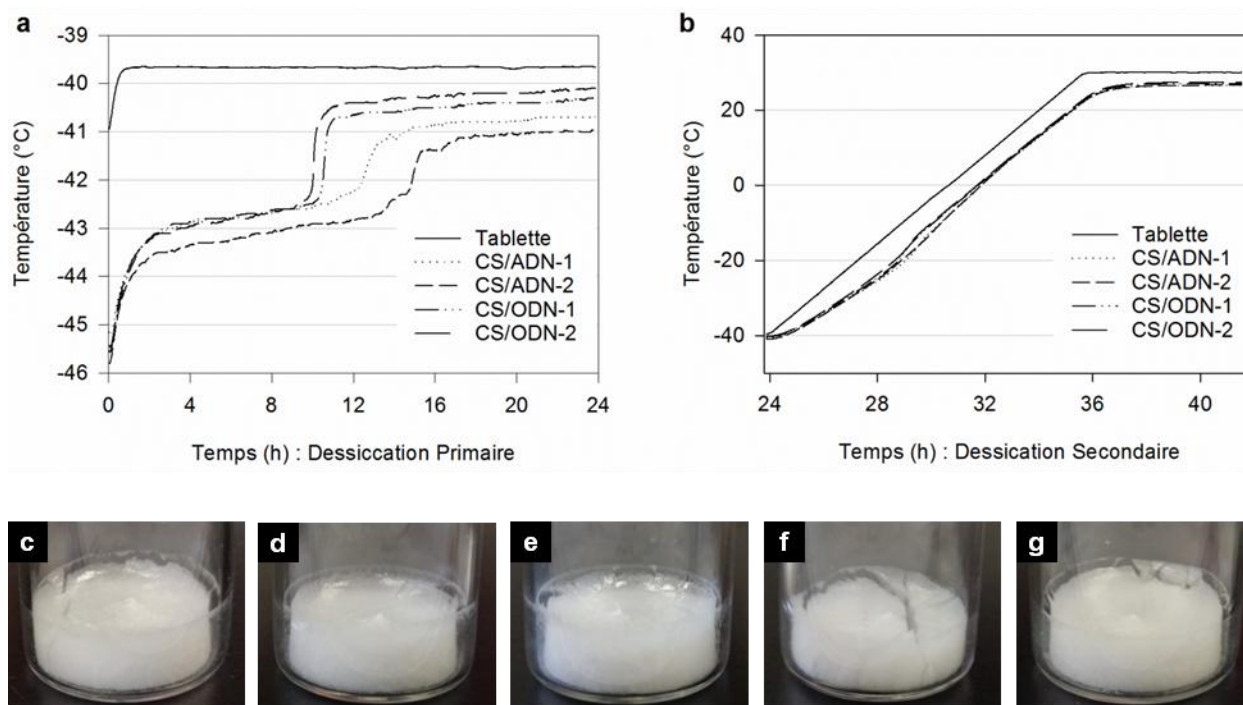


Figure 6.7 Lyophilisation d'échantillons de 2 mL dans des flacons de 10 mL ($l_g = 0.57$ cm) selon un cycle de dessiccation primaire non optimisé. La dessiccation primaire a été effectuée à $T_s = -40$ °C et $P_c = 100$ mTorr, pendant 24 h; la dessiccation secondaire a été effectuée à $P_c = 100$ mTorr, en augmentant la température de la tablette de 0.1 °C/min, jusqu'à 30 °C, puis en maintenant isotherme à 30 °C pendant 6 h. Les profils de température de deux formulations, CS/ADN(N/P=5)-0.5% Tre-His(3.5mM) et CS/ODN(N/P=5)-0.5% Tre-His(1mM), ont été obtenus pendant la dessiccation a) primaire et b) secondaire. Les lyophilisats de ces deux formulations sont présentés en c) et d) respectivement. Trois formulations additionnelles ont été soumises au cycle de lyophilisation : e) CS/ODN(N/P=2)-0.5% Tre-His(1mM); f) HA/CS/ODN-0.5% Tre-His(1mM)-pH6.5; et g) HA/CS/ODN-0.5% Tre-His(2mM)-pH7. La dessiccation primaire des formulations de CS/ODN était plus rapide et uniforme que celle des échantillons de CS/ADN; la dessiccation secondaire était similaire pour les deux types de formulations. Tous les lyophilisats présentaient une légère rétraction radiale, et celui contenant les particules HA/CS/ODN à pH 6.5 (f) était plus fissuré que les autres.

L'effet de la hauteur de remplissage des flacons sur l'efficacité du cycle de dessiccation primaire non optimisé a été évalué. L'analyse précédente ayant montré que la glace était plus lente à sublimer pour les échantillons de CS/ADN (Figure 6.7a), cette formulation a été sélectionnée en supposant que la dessiccation serait plus rapide pour des formulations de CS/ODN lyophilisées

sous les mêmes conditions. Des flacons de 10 mL, remplis à une hauteur de 0.57 ou 2 cm avec la formulation CS/ADN(N/P=5)-0.5%Tre-His(3.5mM), ont été soumis au même cycle de lyophilisation non optimisé décrit précédemment, mais en maintenant la dessiccation primaire pour 48 h au lieu de 24 h. Les profils de température obtenus pendant les phases de dessiccation primaire (Figure 6.8a) et secondaire (Figure 6.8b) ont montré qu'il y avait eu sublimation de l'eau dans les échantillons remplis à 2 cm après 53 h de dessiccation, c'est-à-dire lorsque leur température est augmentée au-delà de -27°C . Par contre, la température des échantillons ne s'est pas stabilisée avant la fin de la phase de dessiccation secondaire (Figure 6.8b), indiquant la présence d'eau résiduelle dans ces derniers à la fin du cycle de lyophilisation. Les produits formaient d'ailleurs une fine couche liquide à la fin du cycle de lyophilisation, confirmant qu'il y avait eu fonte de glace (*melt-back*) dans les échantillons pendant la dessiccation secondaire ou lors de l'arrêt du cycle (Figure 6.8d).

En fait, la sublimation étant un processus endothermique, la température au front de sublimation est inférieure à la température à la base de l'échantillon. Puisque la température moyenne à la base des échantillons était de -43.2°C pendant la dessiccation primaire (Figure 6.8a), la pression de vapeur de la glace à l'interface de sublimation (P_{glace}) était inférieure à 67 mTorr (Équation(6.5)). Sachant que P_c était de 100 mTorr pendant la dessiccation, et que le taux de sublimation est proportionnel au différentiel de pression « $P_{\text{glace}} - P_c$ », alors la sublimation de la glace était très lente dans ces conditions (Tang & Pikal, 2004). Malgré ces conditions de dessiccation défavorables, les échantillons ayant une faible hauteur de remplissage (0.57 cm) étaient solides à la fin du cycle de lyophilisation (Figure 6.8c) : la majeure partie de leur contenu en eau avait sublimé après 14 h, suivi d'une perte additionnelle d'eau pendant les 12 h suivantes, et d'un plateau ($T_p = T_s$ après 36 h, Figure 6.8a). Ce n'était pas le cas des échantillons remplis à 2 cm de hauteur.

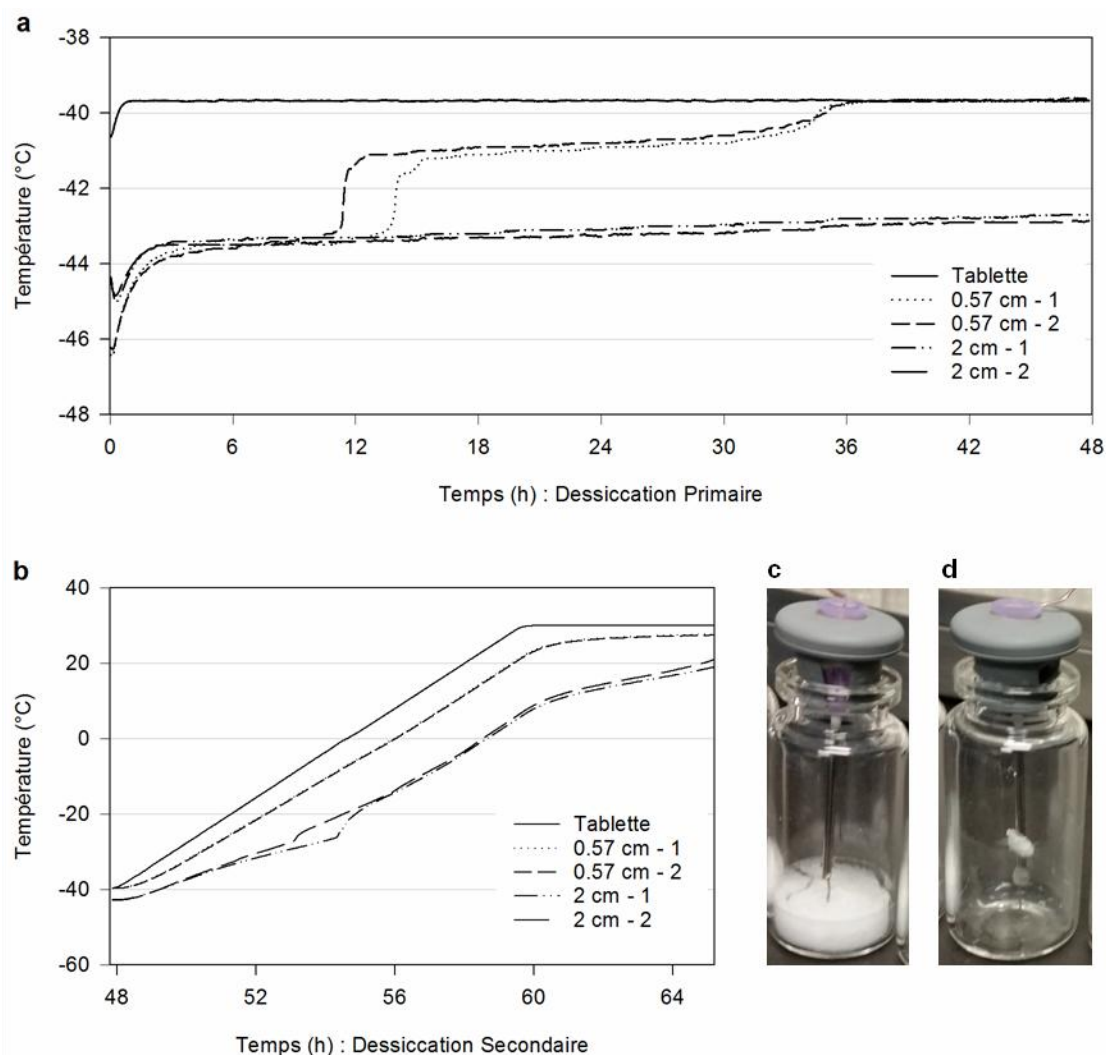


Figure 6.8 Lyophilisation d'échantillons de 2 et 7 mL dans des flacons de 10 mL, soit $l_g = 0.57$ et 2 cm respectivement, selon le cycle non optimisé de dessiccation (a) primaire et (b) secondaire. Les complexes CS/ADN ont été préparés dans 0.5 % m/V tréhalose et 3.5 mM histidine à pH 6.5, à une concentration finale de 50 μg d'ADN/mL. La dessiccation primaire (a) a été effectuée à $T_s = -40$ °C et $P_c = 100$ mTorr, pour 48h; la dessiccation secondaire (b) a été effectuée à $P_c = 100$ mTorr, en augmentant la température de la tablette de 0.1 °C/min jusqu'à 30 °C, puis en la maintenant isotherme pendant 6 h. La sublimation à la base des échantillons de 0.57 cm s'est produite 11 à 14h après le début de la dessiccation (a) et la dessiccation semblait complète après 36 h ($T_p = T_s$). Aucune sublimation n'a été observée à la base des échantillons de 2 cm pendant la phase de dessiccation primaire (a), et la dessiccation demeurerait incomplète à la fin du cycle de lyophilisation (b). Les flacons remplis à une hauteur de 0.57 cm ont formé des lyophilisats blancs

(c); ceux remplis à une hauteur de 2 cm ont formé une pellicule liquide suite à de la fonte de glace résiduelle (*melt-back*) pendant la dessiccation ou à la fin du cycle de lyophilisation.

6.4.4.2 Optimisation de la Phase de Dessiccation Primaire: Première Itération

Afin d'optimiser la phase de dessiccation primaire, et ainsi être en mesure de lyophiliser des volumes d'échantillon atteignant une hauteur l_g de 2 cm, la température de la tablette (T_s) et la pression dans la chambre (P_c) requises ont été calculés à l'aide du modèle proposé par Tang et al. (Équation (6.2) à (6.10)) (Tang & Pikal, 2004). De plus, puisque la T_g' moyenne mesurée pour le tréhalose (Tableau 6.3) était similaire à celle des échantillons contenant des polyplexes (Tableau 6.4), soit -32 et -31.6 °C respectivement, les étapes suivantes du processus d'optimisation de la dessiccation ont été effectuées avec des échantillons contenant seulement 0.5% m/V tréhalose.

Pour cette première phase d'optimisation, la température cible du produit (T_p) a été fixée à -40 °C, ce qui est largement sous la T_g' du tréhalose tout en étant légèrement plus élevé que la T_p de -43.2 °C précédemment mesurée. Des flacons de 10 mL ont été remplis à une hauteur de 0.5, 1, 1.5, et 2 cm, puis ont été soumis à un cycle de lyophilisation identique au précédent, à l'exception de T_s et P_c , qui ont été établies à -38.4 °C et 50 mTorr respectivement à l'aide du modèle mathématique proposé. Il est important de mentionner qu'étant donnée la faible résistance normalisée du produit (faible contenu en excipients), l'impact de la hauteur de remplissage (l_g) sur la T_s nécessaire pour maintenir T_p à -40 °C était négligeable (± 0.2 °C entre $l_g = 0.5$ et 2 cm). Des thermocouples ont été placés dans deux flacons remplis à 2 cm de hauteur, ceux-ci nécessitant la plus longue période de dessiccation. Les paramètres utilisés dans le modèle mathématique et les valeurs calculées sont résumés dans le Tableau 6.5.

Tableau 6.5 Paramètres utilisés pour modéliser la première itération de l'optimisation de la phase de dessiccation primaire.

Paramètre	Valeur	Unités
Hauteur de remplissage (l_g)	2	cm
Température du produit (T_p)	-40	°C
Résistance normalisée du produit (\hat{R}_p)	1	Torr·h·cm ² ·g ⁻¹
Pression de dessiccation (P_c)	50	mTorr
Température de la tablette (T_s)	-38.4	°C

Les profils de température des duplicatas étaient très différents pendant la dessiccation primaire (Figure 6.9a): aucune sublimation n'a été détectée à la base du premier échantillon (0.5%Tre-2cm-1) après 48 h de dessiccation, alors que la sublimation s'est produite en deux étapes dans le deuxième échantillon (0.5%Tre-2cm-2), soit 27.5 et 31 h après l'initiation de la dessiccation. La sublimation de l'eau contenue dans le premier échantillon s'est produite après 49 h, soit une heure après l'initiation de la phase de dessiccation secondaire, lorsque $T_s = -32\text{ °C}$ et $T_p = -40.5\text{ °C}$ (Figure 6.9b). Par la suite, les profils de température sont très similaires entre les échantillons. La disparité observée entre les échantillons pendant la dessiccation primaire pourrait s'expliquer par leurs comportements lors de la congélation: la température de nucléation du deuxième échantillon était 2 °C inférieure à celle du premier échantillon, soit -12 °C au lieu de -10 °C , et la période de croissance des cristaux s'est échelonnée sur 18 min, comparativement à 11 min pour le premier échantillon. En fait, une faible température de nucléation et une surfusion plus importante génèrent habituellement des cristaux plus fins; or la prolongation de la période de croissance des cristaux, qui se déroule à T_p près 0 °C , agit tel un recuit, favorisant la formation de cristaux plus grands et accélérant la sublimation (Hottot et al., 2007; Pikal, M. J. et al., 1983; Schneid & Gieseler, 2008; Searles, James A. et al., 2001; Searles, J. A. et al., 2001).

L'apparence des produits finaux était acceptable pour les échantillons remplis à une hauteur de 0.5 à 1.5 cm (Figure 6.9c à e), ou ceux remplis à 2 cm ayant un thermocouple; les lyophilisats étaient blancs et légèrement rétractés, mais sans fissuration majeure. Les échantillons de 2 cm n'ayant pas de thermocouple étaient réhydratés et formaient une fine couche liquide à la fin du cycle de lyophilisation (Figure 6.9f). En fait, les thermocouples induisent un biais dans les mesures puisqu'ils influencent la congélation des échantillons dans lesquels ils se trouvent en réduisant la surfusion, donc en favorisant la formation de cristaux plus grands, ce qui accélère la phase de dessiccation primaire (Roy & Pikal, 1989). Pour tenir compte de cet effet, la phase de dessiccation primaire est généralement prolongée d'une durée additionnelle équivalente à 10 à 20% du temps nécessaire pour que la sublimation soit complète dans les échantillons avec thermocouple (Tang & Pikal, 2004).

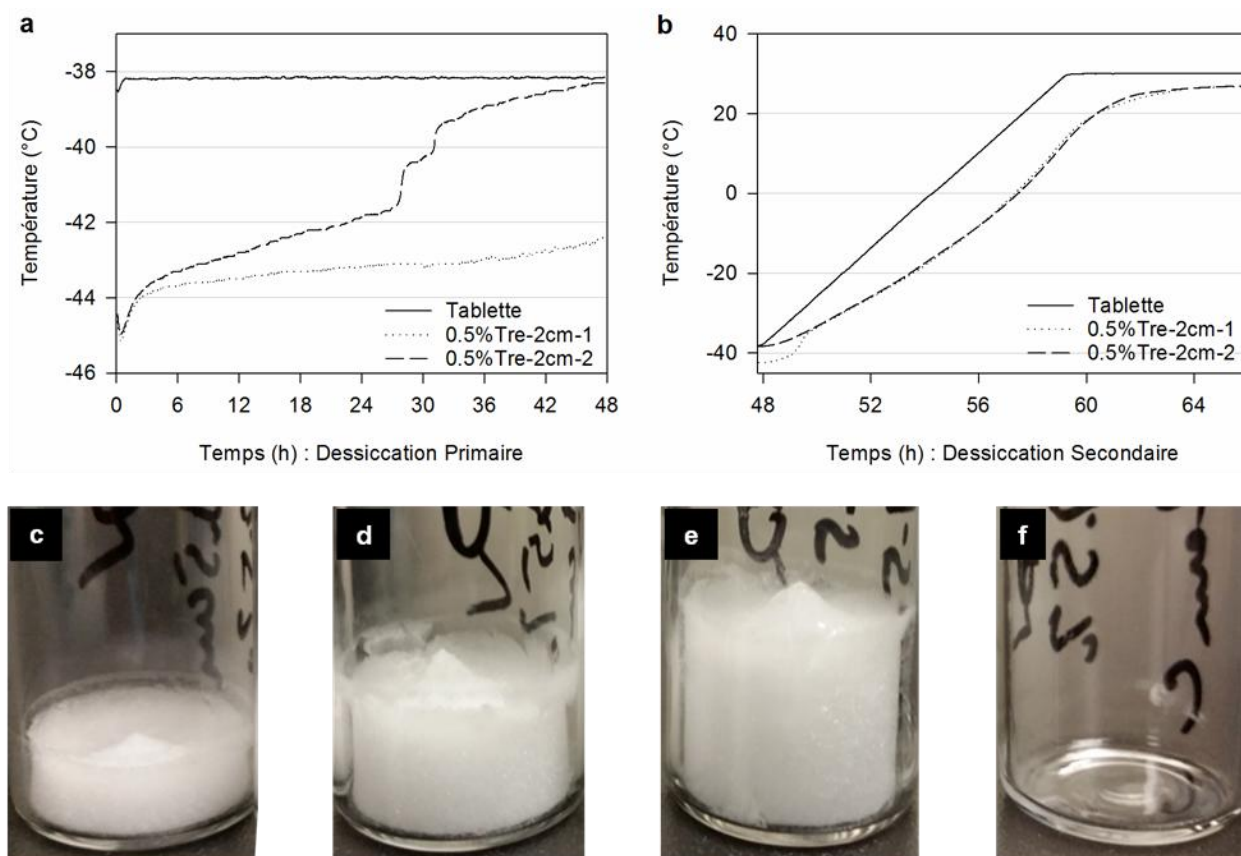


Figure 6.9 Échantillons contenant 0.5 % m/V tréhalose, lyophilisés dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur l_g de 0.5 à 2 cm, selon une phase de dessiccation primaire de 48 h à $T_s = -38.4$ °C et $P_c = 50$ mTorr. La dessiccation secondaire a été effectuée à $P_c = 50$ mTorr, en augmentant la température de la tablette de 0.1 °C/min jusqu'à 30 °C, puis en la maintenant isotherme pendant 6 h. Les profils de température de deux échantillons remplis à 2 cm ont été obtenus pendant les phases de dessiccation a) primaire et b) secondaire. Les lyophilisats obtenus sont présentés pour les diverses hauteurs de remplissage, soit c) 0.5 cm, d) 1 cm, e) 1.5 cm, et f) 2 cm. La sublimation était deux fois plus lente dans l'un des échantillons (a), mais était complète pour les deux échantillons après 50 h (b). Les échantillons ayant une hauteur de remplissage de 1.5 cm ou moins ont formé des lyophilisats blancs (c à e), ceux de 2 cm étaient réhydratés à la fin du cycle de lyophilisation (f).

6.4.4.3 Optimisation de la Phase de Dessiccation Primaire: Seconde Itération

Afin de parvenir à lyophiliser correctement les échantillons ayant une hauteur de remplissage de 2 cm, les conditions de dessiccation primaire ont été revues en fonction d'une nouvelle T_p plus

élevée. En effet, T_p a été choisie en appliquant une marge de sécurité intermédiaire de 3 °C à la T_g' du tréhalose, soit $T_p = -32^{\circ}\text{C} - 3^{\circ}\text{C} = -35^{\circ}\text{C}$ (Tang & Pikal, 2004). Connaissant l_g et \hat{R}_p , T_s et P_c ont été calculées à l'aide du modèle préalablement établi, soit -31.6 °C et 63 mTorr respectivement. Pour des raisons pratiques, la phase de dessiccation primaire a été effectuée à $T_s = -32^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 60$ mTorr. Les paramètres utilisés dans le modèle mathématique et les valeurs utilisées pour la dessiccation primaire sont résumés dans le Tableau 6.6. À nouveau, des flacons de 10 mL, remplis à des hauteurs de 0.5, 1, 1.5, et 2 cm avec une solution de 0.5 % m/V tréhalose, ont été utilisés pour étudier l'efficacité de ces nouvelles conditions de dessiccation primaire. Des thermocouples ont été placés dans certains flacons remplis à 0.5 et 2 cm.

Tableau 6.6 Paramètres utilisés pour modéliser la seconde itération de l'optimisation de la phase de dessiccation primaire.

Paramètre	Valeur	Unités
Hauteur de remplissage (l_g)	2	cm
Température du produit (T_p)	-35	°C
Résistance normalisée du produit (\hat{R}_p)	1	Torr·h·cm ² ·g ⁻¹
Pression de dessiccation (P_c)	60	mTorr
Température de la tablette (T_s)	-32	°C

Dans ces conditions, la sublimation des deux échantillons remplis à 0.5 cm était complète après 5 h de dessiccation primaire, suivie d'une perte additionnelle d'eau, possiblement adsorbée dans la phase vitreuse, s'effectuant dans les 19 h suivantes (Figure 6.10a). La sublimation des échantillons ayant une faible hauteur de remplissage requérant moins de 10 h, l'optimisation de leur phase de dessiccation primaire est moins contraignante (Tang & Pikal, 2004). En effet, la phase de dessiccation primaire pourrait être modifiée en révisant T_p à -37 °C, c'est-à-dire en appliquant une marge de sécurité de 5 °C au lieu de 3 °C à la T_g' du tréhalose. Toutefois, puisque la morphologie des échantillons était acceptable (Figure 6.10c), le cycle pourrait être optimisé en amorçant la dessiccation secondaire après 10 h de dessiccation primaire. Cette prolongation du temps de dessiccation primaire représente une augmentation de 100% par rapport à la durée maximale requise de 5 h, ce qui est amplement suffisant pour tenir compte du biais introduit par la présence des thermocouples dans les échantillons.

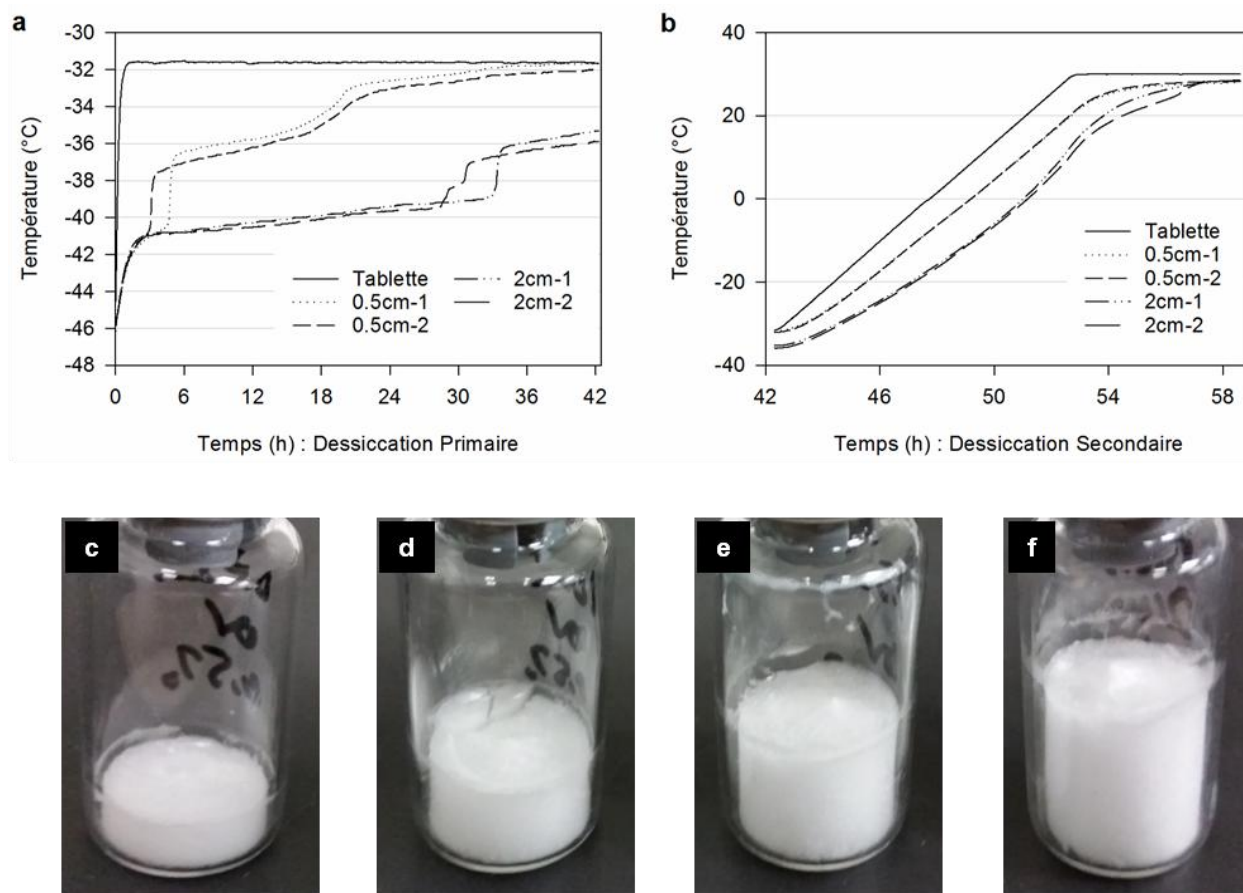


Figure 6.10 Échantillons contenant 0.5 % m/V tréhalose, lyophilisés dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur l_g variant de 0.5 à 2 cm, selon une phase de dessiccation primaire de 42 h à $T_s = -32$ °C et $P_c = 60$ mTorr. La dessiccation secondaire (b) a été effectuée à $P_c = 60$ mTorr, en augmentant la température de la tablette de 0.1 °C/min jusqu'à 30 °C, puis en la maintenant isotherme pendant 6 h. Les profils de température d'échantillons remplis à 0.5 et 2 cm ont été obtenus pendant les phases de dessiccation primaire (a) et secondaire (b). Les lyophilisats obtenus sont présentés pour les diverses hauteurs de remplissage, soit c) 0.5 cm, d) 1 cm, e) 1.5 cm, et f) 2 cm. La sublimation à la base des échantillons de 0.5 cm s'est produite après 3 à 5h de dessiccation, alors qu'elle s'est produite après 29 à 34 h pour ceux de 2 cm (a). La dessiccation semblait complète après 42 h pour les échantillons de 0.5 cm (a), alors qu'elle s'est poursuivie jusqu'à 57.5 h pour ceux de 2 cm (b). Tous les lyophilisats étaient solides et blancs (c à f).

La sublimation dans les échantillons remplis à 2 cm était complète après 34 h de dessiccation primaire (Figure 6.10a), et donc la dessiccation secondaire a été entamée après 42.5 h de dessiccation, soit une prolongation de la durée de la dessiccation primaire de 25%. La désorption

d'eau non cristallisée semblait complète pour ces deux échantillons après 57 h de dessiccation, soit 1.5 h avant la fin du cycle de lyophilisation. Une phase de dessiccation secondaire prolongée pourrait être utilisée afin d'assurer une désorption totale de l'eau contenue dans les échantillons dont la hauteur de remplissage atteint 2 cm. Pour cela, la rampe de température imposée par la tablette pourrait être réduite à 0.075 °C/min au lieu du taux actuel de 0.1 °C/min. Malgré tout, tous les lyophilisats obtenus avec le cycle de lyophilisation actuel étaient solides et blancs (Figure 6.10c à f).

6.4.4.4 Optimisation de la Phase de Dessiccation Secondaire des Échantillons Remplis à une Hauteur de 0.5 cm

Suite aux résultats obtenus précédemment, la phase de dessiccation secondaire a été adaptée pour les échantillons ayant une hauteur de remplissage de 0.5 cm, ce dans le but d'accélérer la durée totale de leur cycle de lyophilisation. Les échantillons de tréhalose à 0.5% m/V ont été lyophilisés dans des flacons de 10 mL, en plaçant des thermocouples dans 4 d'entre eux. La dessiccation primaire a été effectuée à $T_s = -32$ °C et $P_c = 60$, pour 10 h, puis T_s a été augmentée jusqu'à 30 °C à un rythme de 0.2 °C/min, puis a été maintenue isotherme pendant 6 h. Comme anticipé, les profils de température obtenus ont indiqué que la sublimation de la glace contenue dans les 4 échantillons était complète après 10 h de dessiccation primaire (Figure 6.11a). Bien qu'il ne soit pas inhabituel que les profils de température varient entre les échantillons pendant la dessiccation, l'échantillon 0.5cm-1 semble avoir sublimé beaucoup plus rapidement que les autres échantillons. Il est possible que le thermocouple ait accidentellement été déplacé vers la surface de l'échantillon lorsqu'il a été chargé dans le lyophilisateur en début d'expérience, ce qui expliquerait cette sublimation prématurée par rapport aux autres échantillons. Les profils de température observés pendant la dessiccation secondaire sont toutefois très similaires entre les échantillons (Figure 6.11b). La désorption d'eau dans les échantillons semble terminée après ~14.5 h, lorsque T_s atteint ~5 °C et que les profils de température des échantillons deviennent parallèles à celui de la tablette (entre 14.5 et 15 h). Les lyophilisats obtenus étaient solides et blancs, tel qu'observé précédemment, avant l'optimisation de la phase de dessiccation secondaire (voir Figure 6.10c). Malgré la rapidité du cycle de lyophilisation actuel (25 h), il serait possible, si nécessaire, d'écourter le cycle de 2 à 3 h puisque la température des échantillons est stabilisée entre 25 et 26 °C à ce stade.

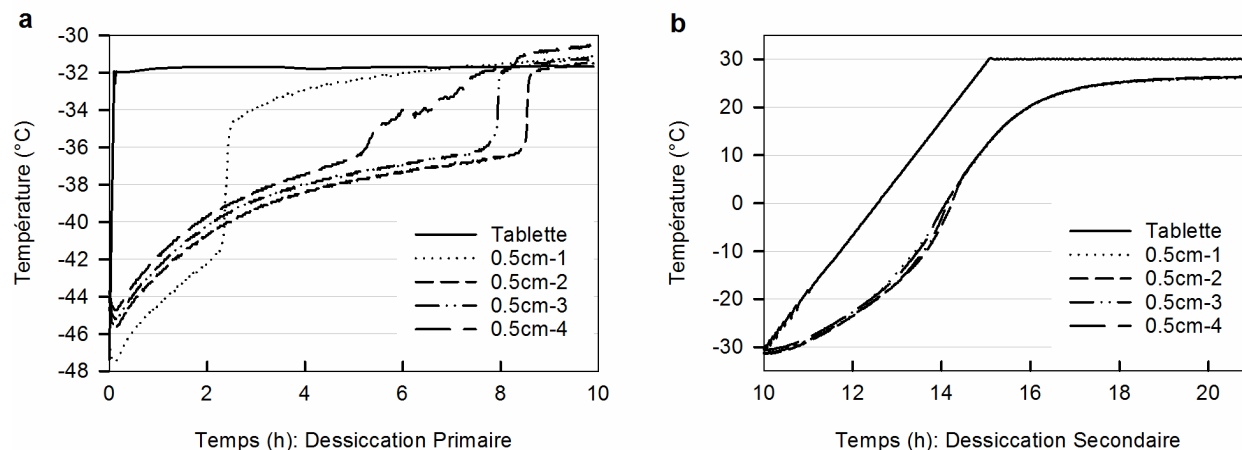


Figure 6.11 Optimisation de la phase de dessiccation secondaire d'échantillons contenant 0.5% m/V tréhalose lyophilisés dans des flacons de 10 mL remplis à une hauteur l_g de 0.5 cm. Les échantillons ont été soumis à une phase de dessiccation primaire de 10 h, à $T_s = -32$ °C et $P_c = 60$ mTorr, suivie d'une phase de dessiccation secondaire effectuée à $P_c = 60$ mTorr, en augmentant la température de la tablette de 0.2 °C/min jusqu'à 30 °C, puis en la maintenant isotherme pendant 6 h. Les profils de température des 4 échantillons sont présentés pour les phases de dessiccation a) primaire et b) secondaire : ils étaient très variables entre les échantillons pendant la dessiccation primaire, mais très similaires pendant la dessiccation secondaire.

6.5 Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis d'évaluer l'impact de divers paramètres sur la T_g' estimée et mesurée des formulations, sur la microstructure des lyophilisats, et sur l'optimisation des phases de lyophilisation, notamment la congélation, la dessiccation primaire, et la dessiccation secondaire. Les résultats ont démontré que les polyplexes, dont la concentration est très faible par rapport aux excipients, avaient un effet négligeable sur la T_g' mesurée des formulations. Il a aussi été démontré que le modèle de Fox peut être utilisé pour estimer la T_g' des formulations avec une marge d'erreur de $\pm 7\%$. L'analyse des lyophilisats par SEM a démontré qu'une concentration de 5% m/V dextran ou tréhalose favorisaient la formation de réseau poreux de feuillets, alors que 5% m/V sucrose ou 0.5% m/V sucrose, dextran ou tréhalose, menait à la formation de matrices fibreuses. L'analyse des profils de température des échantillons pendant la lyophilisation a permis de confirmer qu'une augmentation de la hauteur de remplissage des flacons de 0.5 à 2 cm influence la congélation et la dessiccation des

échantillons en prolongeant les phases de nucléation et de sublimation de la glace. Le modèle proposé par Tang et Pikal s'est d'ailleurs révélé excellent pour optimiser la température de la tablette et la pression dans l'appareil pendant la dessiccation. Ainsi, les formulations contenant 0.5% m/V tréhalose, ayant une hauteur de remplissage maximale de 0.5 ou 2 cm, ont pu être lyophilisées en 25 ou 62.5 h respectivement. Ces cycles optimisés s'appliquent aux formulations de polyplexes optimisées aux Chapitre 4 et Chapitre 5, et toute modification, telle que l'augmentation du contenu en excipient, l'augmentation de la hauteur de remplissage des flacons au-delà de 2 cm, ou l'usage de flacons différents, nécessiterait une réévaluation des paramètres du cycle de lyophilisation. Afin de mener à terme les travaux d'optimisation des cycles de lyophilisation, il serait pertinent de mesurer le contenu en humidité résiduelle et la transition vitreuse (T_g) des formulations lyophilisées obtenues. Il serait aussi pertinent d'évaluer la stabilité de ces échantillons à l'aide d'études de stabilité accélérées et d'étude de stabilité à long terme.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

La première étude réalisée, dont les résultats ont été publiés (Chapitre 4), visait à développer une formulation lyophilisée contenant des complexes CS/ADN et pouvant être réhydratée à des concentrations plus élevées. Nous avons commencé les travaux en effectuant des études de gel-dégel afin d'identifier des lyoprotectants potentiels et les concentrations minimales requises pour préserver la taille et la distribution des tailles des polyplexes. Le sucrose, le dextran 5 kDa et le tréhalose préservaient les propriétés physicochimiques des polyplexes à une concentration de 0.5% m/V, alors que le mannitol n'y parvenait pas à une concentration de 3% m/V. Or, des quatre lyoprotectants testés, le mannitol est le seul qui a tendance à cristalliser pendant la congélation. Ces résultats suggèrent donc que la formation d'une matrice amorphe est nécessaire pour éviter l'agrégation des polyplexes à base de chitosane dans la phase cryoconcentrée, ce qui est conforme avec l'hypothèse de l'isolement particulaire (*particle isolation/vitrification hypothesis*).

Toutefois, ces formulations n'ont pas pu empêcher l'agrégation des complexes après lyophilisation sans l'ajout d'une faible quantité d'histidine à pH 6.5, soit 3.5 mM. En fait, en plus de maintenir le pH des formulations à des valeurs quasi physiologiques, ce tampon aurait possiblement un effet stabilisateur critique sur les polyplexes lors de la dessiccation. Les fonctions imidazole aromatiques des molécules d'histidine formeraient des liaisons cation- π avec les groupements amines du chitosane. Ces interactions étant plus fortes que les interactions entre les cations et l'eau, les molécules d'histidine aideraient à préserver l'intégrité des polyplexes en formant une couche protectrice selon un mécanisme conforme avec l'hypothèse du remplacement de l'eau (*water replacement hypothesis*). Les lyoprotectants, particulièrement le tréhalose, sont généralement reconnus pour leur capacité à former des liaisons hydrogène stabilisatrices avec les agents lyophilisés lors du retrait de l'eau. Or, la concentration des formulations devant être augmentée le plus possible lors de la réhydratation, leur contenu en excipient devait être réduit de façon proportionnelle afin d'éviter qu'elles deviennent hypertoniques. Compte tenu de la faible concentration en lyoprotectant utilisée dans les formulations, soit 0.5% m/V, il n'est pas étonnant que leur effet stabilisateur ait été atténué, d'où l'importance d'ajouter l'histidine.

Des formulations de complexes CS/ADN contenant 3.5 mM histidine et 0.5% m/V sucrose, dextran ou tréhalose, ont été lyophilisées puis réhydratées à une concentration jusqu'à 20 fois plus élevée qu'initialement. Les polyplexes lyophilisés avec du sucrose ou du tréhalose avaient

des tailles et des distributions de tailles, ou indices de polydispersité (PDI), plus faibles que ceux lyophilisés avec le dextran. Les résultats obtenus en transfection ont aussi montré que l'expression protéique des cellules transfectées avec les polyplexes lyophilisés dans le dextran variait énormément. En fait, le dextran 5 kDa possédant une masse molaire ~15 fois supérieure à celle du sucrose et du tréhalose, sa mobilité conformationnelle est plus limitée que celles des disaccharides. Cette contrainte pourrait limiter la capacité du dextran à former des liaisons hydrogène stabilisatrices avec les polyplexes, expliquant la variabilité accrue des résultats observés pour ces polyplexes. Une autre limitation des formulations contenant le dextran 5 kDa était leur caractère largement hypotonique après réhydratation, ce même à des concentrations 20 fois plus élevées. La concentration initiale de dextran utilisée dans les formulations aurait pu être augmentée pour résoudre ces deux problématiques, toutefois cette approche aurait causé une augmentation indésirable de la viscosité des formulations finales concentrées. La formulation contenant le tréhalose a ensuite été retenue pour confirmer la biocompatibilité des formulations *in vitro* sur la lignée cellulaire HEK293. Le CS libre et les complexes CS/ADN, fraîchement préparés ou réhydratés à diverses concentrations, n'affectaient ni l'activité métabolique des cellules ni l'intégrité de leur membrane plasmique. Ces résultats étaient attendus, la biocompatibilité du chitosane et des excipients choisis ayant préalablement été démontrée.

Puisque les résultats obtenus pour les polyplexes de CS/ADN lyophilisés en présence de sucrose et de tréhalose étaient très similaires, la T_g' des compositions a été caractérisée par mDSC afin de déterminer si l'un des lyoprotectants était plus avantageux pour le développement des formulations subséquentes. En effet, les formulations dont la T_g' est plus élevée peuvent être lyophilisées plus rapidement. Les T_g' mesurées pour les divers excipients étaient similaires à celles reportées dans la littérature; celle du tréhalose était environ 2 °C supérieure à celle du sucrose. Tel qu'estimé à l'aide du modèle de Fox, les T_g' mesurées pour les formulations étaient très près de celles des lyoprotectants, ceux-ci étant largement prédominants dans les compositions par rapport au tampon histidine, au chitosane libre, et aux polyplexes. La précision du modèle de Fox était maximale (erreur de 1.2%) pour les formulations de complexes possédant du sucrose ou du tréhalose. Malgré les différences de T_g' observées, le principal argument favorisant l'usage de tréhalose serait sa T_g , qui est au moins 40 °C supérieure à celle du sucrose selon la littérature. Comme mentionné à la section 2.4.1, les formulations ayant une T_g plus élevée affichent généralement une stabilité supérieure lors de l'entreposage à long terme à température ambiante.

Or, la T_g des formulations étant fortement affectée par la présence d'humidité résiduelle dans les lyophilisats, ces valeurs ne pouvaient être mesurées avant l'optimisation des cycles de lyophilisation. Sachant que la T_g des formulations est directement influencée par leur contenu en excipient, nous avons décidé de poursuivre le développement des formulations en utilisant le tréhalose comme lyoprotectant. Des images obtenues par microscopie électronique à balayage (SEM) ont d'ailleurs confirmé que les lyophilisats contenant du tréhalose étaient moins sujets au microaffaissement que ceux contenant du sucre. Le microaffaissement était toutefois inévitable dans les lyophilisats contenant 0.5% m/V lyoprotectant, possiblement dû à leurs propriétés mécaniques moindres, mais cela n'affectait en rien leur réhydratation.

Nous avons ensuite entamé le développement de nouvelles formulations de polyplexes CS/ARNic en nous basant sur les connaissances préalablement acquises. Les observations précédentes semblant indiquer que le tampon histidine interagissait avec le chitosane, nous avons entamé le développement des nouvelles formulations par une étude de l'impact de divers tampons sur les propriétés physicochimiques de polyplexes. Toutefois, puisque les ARNics sont des molécules coûteuses, nous avons par la même occasion entrepris de vérifier si les ODNs pouvaient être utilisés en remplacement des ARNics pour effectuer les phases préliminaires de criblage des formulations pour la lyophilisation. Ces molécules avaient en effet été utilisées dans certaines de nos publications antérieures pour effectuer la caractérisation physicochimique de polyplexes fraîchement préparés, pour ensuite effectuer des études *in vitro* avec des complexes CS/ARNic. Nous avons donc utilisé la DLS, la vélocimétrie laser Doppler (LDV), la NTA, et une méthode colorimétrique à base d'Orange II pour établir une relation entre la taille, la distribution des tailles (PDI), la charge de surface, la concentration, et le pourcentage de chitosane libre de polyplexes de CS/ODN, préparés à des ratios N/P de 2 ou 5, en présence de divers tampons dont le pH variait entre 6.3 et 7.0, et la force ionique variait entre 1 et 42 mOsm. En présence de phosphate de sodium ou d'acide maléique, les complexes préparés à N/P = 2 agrégeaient avec l'augmentation du pH des formulations de 6.72 à 6.93-7.02. Cette agrégation était amplifiée lorsque la force ionique de ces tampons augmentait de 20 à 40 mM, l'augmentation de la concentration des contre-ions divalents dans les formulations favorisant l'écrantage d'une proportion plus importante de charges à la surface des polyplexes. Les formulations contenant les tampons Tris-acide maléique ou histidine maintenaient un pH inférieur ou égal à 6.76 pour toutes les forces ioniques évaluées. Les polyplexes formés à N/P = 5 étaient moins affectés par

l'augmentation du pH et de la force ionique, bien que leurs tailles augmentent de façon linéaire et leurs distributions de tailles diminuent de façon exponentielle. La concentration plus élevée de chitosane libre dans ces formulations aurait possiblement un effet stabilisateur sur les polyplexes formés en présence de tampons ayant une force ionique plus élevée, empêchant leur agrégation tout en leur permettant d'adopter une morphologie plus uniforme ($PDI \leq 0.05$). Indépendamment du ratio N/P utilisé, les propriétés physicochimiques des polyplexes CS/ODN étaient optimales en présence d'histidine, qui ne contient pas de contre-ions divalents. Considérant la cryoconcentration subie par les formulations pendant la lyophilisation et leur réhydratation à des concentrations jusqu'à 20 fois plus élevées, il était prévisible que les propriétés des polyplexes soient optimales lorsqu'ils étaient lyophilisés en présence d'histidine et de tréhalose à 0.5% m/V. En effet, à concentration molaire égale, histidine était le tampon dont la force ionique était la plus faible. Afin d'arriver à tamponner les formulations à pH 6.5, la concentration d'histidine n'a pu être réduite sous 1 mM.

Les polyplexes ont ensuite été couverts d'acide hyaluronique (HA) afin d'adresser deux objectifs de la thèse, soit obtenir des formulations à pH neutre, qui ont une hémocompatibilité accrue. En effet, il était impossible de préparer les formulations à pH neutre en absence de HA sans provoquer une sévère agrégation des polyplexes étant donnée à la baisse de la densité de charge du CS. Les nanoparticules résultantes étaient plus grandes, étant donnée la couche additionnelle de HA, et leurs propriétés physicochimiques après lyophilisation et réhydratation étaient relativement similaires indépendamment du tampon et du pH final des formulations, soit 6.5 ou 7. Ces résultats sont probablement dus à la surface très négative de polyplexes ($ZP < -30$ mV), qui serait peu affectée par les tampons anioniques ou ayant une faible proportion de molécules cationiques, de même qu'au poids moléculaire élevé du HA, qui favoriserait la répulsion stérique entre les polyplexes dans la phase cryoconcentrée. Contrairement aux formulations à pH 6.5, celles à pH 7 nécessitaient un minimum de 2 mM de tampon pour maintenir le pH constant après réhydratation des lyophilisats.

L'efficacité des formulations préalablement optimisées pour la lyophilisation a ensuite été évaluée pour les polyplexes à base d'ARNic. Les objectifs étaient de: 1) vérifier si les résultats obtenus avec l'ARNic étaient comparables à ceux obtenus avec l'ODN, donc valider si l'ODN est une bonne alternative à l'ARNic pour la phase d'optimisation des formulations; 2) valider les propriétés physicochimiques des polyplexes avant leur usage *in vitro*. De plus, puisque nos

études de silençage *in vitro* visent un gène rapporteur, la séquence des ARNics utilisés pour former ces polyplexes diffère de la séquence des ARNics qui seront utilisés dans les modèles thérapeutiques des études animales et cliniques. Nous avons donc étudié l'impact de divers paramètres associés aux séquences des oligonucléotides sur les polyplexes formés avec le chitosane à divers ratios N/P. Une première observation inattendue fut de constater qu'il était impossible de former des complexes CS/ARNic stables à $N/P = 2$ avec les séquences spécifiques pour eGFP, alors que ce n'était pas le cas avec les ODNs ayant les mêmes séquences ou les ARNics visant le gène ApoB. En effet, un ratio N/P de 2.5 a dû être utilisé pour former des complexes stables avec les séquences visant eGFP. Ces données préliminaires semblaient supporter deux phénomènes préalablement rapportés dans la littérature pour des cations multivalents ou des polyamines: 1) les ARNics sont plus difficiles à condenser que les ODN; 2) les amines se lient plus fortement aux séquences riches en AT comparativement à celles riches en GC. En effet, les séquences spécifiques pour ApoB contenaient 61% de bases AT alors que celles spécifiques pour eGFP contenaient seulement 45 à 48% de bases AT. Des études de lyophilisation ont d'ailleurs permis d'observer que la majorité des polyplexes formés à faible ratio N/P (2 ou 2.5) avec de l'ARNic avaient des tailles supérieures à ceux contenant de l'ODN après réhydratation. Ce phénomène était d'ailleurs plus prononcé pour les complexes formés avec les séquences spécifiques à eGFP. Finalement, les oligonucléotides contenant au moins une extrémité franche avaient des tailles et des PDIs plus élevés que ceux ayant deux extrémités cohésives. En incubant des polyplexes formés à $N/P = 1$ avec un colorant fluorescent spécifique pour les acides nucléiques, nous avons observé que les ARNics contenant au moins une extrémité franche sont condensés moins efficacement que les ODNs correspondants. Ces observations ont été confirmées en titrant des oligonucléotides contenant au moins une extrémité franche avec du chitosane, c'est-à-dire en mesurant la taille et la densité de charge des polyplexes formés à des ratios N/P variant de 0.7 à 1.5. Les résultats suggéraient que les ARNics nécessitaient entre 20 et 30% plus de chitosane que les ODNs correspondant pour éviter l'agrégation.

Il est bien sûr possible d'augmenter la stabilité des complexes pendant la lyophilisation en augmentant le ratio N/P des polyplexes. En effet, les tailles et les PDIs des polyplexes formés à $N/P = 5$ se limitaient à 226 nm et 0.30 respectivement après lyophilisation et réhydratation à 20 fois la concentration initiale (Rh20X). Tel qu'observer précédemment à $N/P = 2.5$, les polyplexes Rh20X ayant la taille et le PDI les plus élevés à $N/P = 5$ étaient ceux préparés avec l'ARNic

visant eGFP ayant deux extrémités franches. Ceux formés à $N/P = 5$ avec la séquence eGFP aux extrémités cohésive affichaient une taille de 170 nm et un PDI de 0.20 après Rh20X. Ces complexes ont d'ailleurs préservé leur efficacité de silençage et leur biocompatibilité *in vitro*, tel que mesuré sur une lignée H1299 exprimant eGFP. Malgré leur stabilité plus élevée pendant la lyophilisation, leur efficacité de silençage et leur biocompatibilité *in vitro*, les polyplexes préparés à $N/P = 5$ demeurent hématotoxiques à dose élevée. En effet, le chitosane en solution provoquant l'hémolyse et l'héماغglutination, les polyplexes CS/ARNic formés à $N/P = 5$, qui ont une proportion importante de chitosane libre, affichaient aussi ces effets indésirables. Ceux à $N/P = 2$ n'étaient pas hémolytiques (hémolyse < 5%), mais provoquaient tout de même l'héماغglutination. Étonnamment, les polyplexes couverts de HA à pH 6.5 provoquaient l'héماغglutination et, bien qu'ils ne fussent pas hémolytiques aux doses testées, ils semblaient afficher une dose-réponse. Malgré tout, les formulations de polyplexes couverts de HA à pH 7 ne provoquaient ni l'hémolyse ni l'héماغglutination. Ces 4 formulations ont été observées au microscope électronique à transmission (TEM) afin de comprendre les résultats inattendus pour les tests d'hémocompatibilité. Les observations semblent indiquer une distribution inégale du HA autour des particules, possiblement due au cycle de lyophilisation, ce qui aurait pour effet d'exposer du chitosane chargé au milieu environnant. À pH 7, la densité de charges sur le chitosane exposé aux érythrocytes serait moindre, ce qui expliquerait l'hémocompatibilité accrue de ces formulations.

Enfin, le dernier objectif de la thèse consistait à optimiser les cycles de lyophilisation afin de permettre la production d'échantillons plus volumineux; de réduire leur temps de production; et donc améliorer le rendement du lyophilisateur. L'optimisation des différentes phases du cycle de lyophilisation, soit la congélation, la dessiccation primaire et la dessiccation secondaire, a été effectuée en analysant les profils de température des échantillons pendant ces étapes. Bien que l'analyse de la pression permette une meilleure identification de la fin de la dessiccation, la configuration de l'appareil utilisé pour effectuer la lyophilisation ne permettait pas l'usage de cette méthode. Nos analyses des cycles de congélation n'ont pas permis de confirmer que l'usage d'isothermes favorisait une cristallisation plus uniforme des échantillons, mais ont permis de valider que la cristallisation était complète dans tous les échantillons avant d'entamer la dessiccation, qu'ils aient un volume de remplissage plus ou moins élevé. L'usage de ces isothermes a toutefois été maintenu puisque nos analyses n'étaient pas aussi exhaustives que

celles publiées dans la littérature, lesquelles mentionnaient un gain en matière d'uniformité entre les divers échantillons congelés de cette façon. La dessiccation primaire a ensuite été optimisée en estimant la température de la tablette et la pression nécessaire pour lyophiliser des échantillons contenant 0.5% m/V tréhalose à l'aide du modèle publié par Tang et Pikal. Ainsi, en utilisant une température de tablette de -32 °C et une pression de 60 mTorr, les temps de dessiccation primaire ont pu être réduits à 10 et 42.5 h pour des échantillons dont la hauteur de remplissage des flacons atteignait 0.5 et 2 cm respectivement. Pour les échantillons ayant une faible hauteur de remplissage, la dessiccation secondaire a aussi pu être accélérée, de sorte que la durée totale des cycles de lyophilisation variait de 25 à 62.5 h selon les hauteurs de remplissage. Donc, afin d'éviter l'affaissement des lyophilisats et de minimiser la durée des cycles de lyophilisation, il est préférable d'éviter de remplir les flacons au-delà d'une hauteur de 2 cm.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Une première étude nous a permis d'identifier des lyoprotectants et un tampon qui, agissant en synergie, ont permis de limiter les concentrations d'excipient nécessaires afin de préserver les propriétés physicochimiques, l'activité biologique, et la biocompatibilité de polyplexes CS/ADN ($N/P = 5$) après lyophilisation et réhydratation. Les polyplexes lyophilisés avec 0.5% m/V sucrose ou tréhalose, et 3.5 mM histidine à pH 6.5, ont ainsi pu être réhydratés à une concentration jusqu'à 20 fois plus élevée, soit une dose finale d'environ 1 mg d'ADN/mL, tout en demeurant quasi-isotonique. Ces nouvelles formulations représentent une amélioration considérable des formulations précédentes, qui étaient jusqu'à maintenant trop acides ($pH \approx 5$) et diluées ($\sim 50 \mu\text{g}$ d'ADN/mL) pour un usage en clinique. Compte tenu des propriétés hématotoxiques de formulations similaires contenant des oligonucléotides, l'administration de ces polyplexes concentrés par voie intraveineuse serait à éviter *in vivo*. Dans leur forme actuelle, l'efficacité de ces formulations pourrait être évaluée *in vivo* par voie sous-cutanée, intramusculaire, intranasale, etc. Si une administration intraveineuse de ces polyplexes CS/ADN est désirable, il serait pertinent d'étudier la possibilité d'en modifier la surface de chitosane, par exemple en ajoutant une couche de HA ou de polyéthylène glycol (PEG), afin de rendre les formulations hémocompatibles.

Des travaux ont ensuite permis d'évaluer l'impact de divers tampons, du pH des formulations, des séquences des oligonucléotides, et de l'ajout de HA sur les propriétés physicochimiques, l'efficacité de silençage, et la biocompatibilité de polyplexes CS/oligonucléotides lyophilisés et réhydratés à des concentrations 20 fois plus élevées (concentration finale de $\sim 2 \text{ mg}$ d'ARNic ou d'ODN/mL). Le choix du tampon utilisé dans les formulations préparées à faible ratio N/P , soit $N/P = 2$, s'est avéré critique, les tampons contenant des contre-ions dianioniques provoquant l'agrégation des polyplexes cationiques lorsque leur concentration, donc leur force ionique, augmente. Le tampon histidine ne possédant aucune espèce dianionique, il était optimal pour les formulations. Les séquences des oligonucléotides utilisés pour former les polyplexes à faible ratio N/P avaient aussi un impact sur leurs propriétés physicochimiques, avant ou après lyophilisation en présence de 0.5% m/V tréhalose et 1 mM histidine à pH 6.5. En fait, la capacité du chitosane à condenser les oligonucléotides et la stabilité de ces polyplexes pendant la lyophilisation semblaient diminuer pour les ARNics vs les ODNs; pour les séquences riches en

GC vs les séquences riches en AT; et pour les séquences ayant au moins une extrémité franche vs les séquences ayant des extrémités cohésives. L'usage d'un ratio N/P plus élevé, soit $N/P = 5$, permettait de limiter l'impact du choix de l'oligonucléotide sur les propriétés physicochimiques des polyplexes avant et après lyophilisation. Ces formulations étaient d'ailleurs biocompatibles et préservaient leur activité biologique *in vitro* après lyophilisation et réhydratation à 20 fois la concentration initiale. Toutefois, l'augmentation de la quantité de chitosane libre dans ces formulations les rend hémolytiques, ce qui limite leur usage par voie intraveineuse. Ainsi, afin de limiter le ratio N/P des polyplexes tout en maximisant leur stabilité, les études futures auraient intérêt à considérer l'usage d'oligonucléotides ayant un contenu élevé en bases AT, dont les extrémités sont cohésives. Il pourrait aussi être intéressant de caractériser, par microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC), l'affinité de chitosanes ayant diverses masses moléculaires et degrés de désacétylation (DDA) pour ces oligonucléotides afin d'optimiser la stabilité de ces formulations à faible ratio N/P.

Les formulations de polyplexes couverts de HA développées ont affiché des propriétés très prometteuses pour un usage futur dans le cadre de thérapies intraveineuses. En effet, ces formulations ont pu être lyophilisées en présence de divers tampons, à pH 6.5 ou pH 7, sans provoquer leur agrégation. Non seulement ces formulations ont pu être préparées à pH neutre, mais les polyplexes couverts de HA préparés à pH 7 n'ont provoqué aucune hémolyse ou hémagglutination *in vitro*. Ces propriétés sont en effet critiques dans l'optique de thérapies intraveineuses futures impliquant l'injection de solutions concentrées ou de grands volumes de formulation. Toutefois, selon des images obtenues par microscopie électronique à transmission (TEM), la couverture de HA sur les polyplexes ne semblait pas uniforme après réhydratation. Une caractérisation plus approfondie de ces systèmes serait bénéfique, notamment l'optimisation de la couverture de HA, par exemple en utilisant des combinaisons de HA de diverses masses molaires remplissant diverses fonctions. De plus, il serait important de développer un modèle de silençage *in vitro* adéquat afin de pouvoir évaluer l'activité biologique de ces formulations avant d'en évaluer l'efficacité *in vivo*.

Afin de parvenir à optimiser les cycles de lyophilisation des formulations, nous avons évalué la température de transition vitreuse de solution cryoconcentrée (T_g') de diverses formulations et de leurs excipients, et avons déterminé que les polyplexes n'affectaient pas la T_g' finale des formulations. Nous avons d'ailleurs confirmé que le modèle de Fox permettait d'estimer avec

exactitude les T_g ' de nos formulations, particulièrement celles contenant du sucrose ou du tréhalose. L'observation de divers lyophilisats par microscopie électronique à balayage (SEM) a ensuite permis de constater que le sucrose est plus susceptible au microaffaissement de tréhalose, validant ainsi le choix d'utiliser ce lyoprotectant dans le développement de nos formulations. Les cycles de lyophilisation ont été optimisés pour les échantillons contenant 0.5% m/V tréhalose, pour diverses hauteurs de remplissage des flacons. Ainsi, la durée des cycles a pu être réduite à 25 et 62.5 h, pour des échantillons ayant une hauteur de remplissage de 0.5 et 2 cm respectivement, sans affecter la morphologie macroscopique des lyophilisats. Malgré ces résultats très encourageants, une caractérisation additionnelle des lyophilisats devrait être effectuée dans le futur. En effet, afin de confirmer que la dessiccation était complète, il serait pertinent de mesurer l'humidité résiduelle dans les lyophilisats par titrage coulométrique Karl Fisher. De plus, il serait important de caractériser la transition vitreuse (T_g) des produits finaux afin d'avoir une estimation de la température maximale à laquelle ils peuvent être entreposés. L'observation par SEM ou TEM de la microstructure des lyophilisats obtenus pourrait fournir des informations additionnelles sur l'efficacité des cycles de lyophilisation optimisés. Finalement, des études de stabilité accélérées et à long terme devront être réalisées sur les produits lyophilisés afin de confirmer le potentiel commercial des formulations de polyplexes développées.

Les travaux de la thèse ont ainsi permis d'identifier des compositions biocompatibles des polyplexes CS/ADN et CS/ARNic pouvant être lyophilisées et réhydratées à des concentrations d'au moins 1 mg d'acide nucléique/mL, tout en étant quasi isotoniques et en préservant leurs propriétés physicochimiques et leur activité biologique. Des formulations hémocompatibles de polyplexes couverts de HA, préparées et lyophilisées à pH neutre, ont aussi été développées. Ces travaux ont aussi permis d'établir que les ODNs ne peuvent pas être utilisés comme remplacement abordable des ARNic pour le développement de compositions lyophilisées, et que la séquence des ARNic utilisés pour former les polyplexes peut influencer leurs propriétés avant et après la lyophilisation. Finalement, la durée des cycles de lyophilisation a pu être minimisée à l'aide d'un modèle numérique, selon la T_g ' des formulations et les volumes de remplissage des échantillons. Malgré les nombreuses recommandations discutées précédemment, les formulations concentrées développées dans le cadre de cette thèse présentent de nombreuses et excellentes perspectives cliniques, qu'il s'agisse d'applications IV, dans le cas des complexes couverts de HA, ou d'applications SC, IM, intranasales, etc., pour les formulations sans HA.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abdelwahed, W., Degobert, G., & Fessi, H. (2006a). Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. *International Journal of Pharmaceutics*, 324(1), 74-82. doi:10.1016/j.ejps.2009.05.008
- Abdelwahed, W., Degobert, G., & Fessi, H. (2006b). Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63(2), 87-94. doi:10.1016/j.ejpb.2006.01.015
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688-1713. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017
- Al-Dosari, M. S., & Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent progress. *The AAPS Journal*, 11(4), 671-681. doi:10.1208/s12248-009-9143-y
- Al-Hussein, A., & Gieseler, H. (2015). Investigation of the stabilizing effects of hydroxyethyl cellulose on LDH during freeze drying and freeze thawing cycles. *Pharmaceutical Development and Technology*, 20(1), 50-59. doi:10.3109/10837450.2013.862260
- Alameh, M., DeJesus, D., Jean, M., Darras, V., Thibault, M., Lavertu, M., . . . Merzouki, A. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1399-1414. doi:10.2147/ijn.s26571
- Alkhamis, K. A. (2009). Influence of solid-state acidity on the decomposition of sucrose in amorphous systems II (effect of buffer). *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(4), 408-416. doi:10.1080/03639040802422096
- Allison, S. D., & Anchordoquy, T. J. (2000). Mechanisms of protection of cationic lipid-DNA complexes during lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(5), 682-691. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200005)89:5<682::AID-JPS14>3.0.CO;2-#
- Almalik, A., Donno, R., Cadman, C. J., Cellesi, F., Day, P. J., & Tirelli, N. (2013). Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: Molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation. *Journal of Controlled Release*, 172(3), 1142-1150. doi:10.1016/j.jconrel.2013.09.032
- Anchordoquy, T. J., Allison, S. D., Molina, M. d. C., Girouard, L. G., & Carson, T. K. (2001). Physical stabilization of DNA-based therapeutics. *Drug Discovery Today*, 6(9), 463-470. doi:10.1016/S1359-6446(01)01739-1
- Anchordoquy, T. J., Armstrong, T. K., & Molina, M. d. C. (2005). Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: Concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6), 1226-1236. doi:10.1002/jps.20353
- Anchordoquy, T. J., & Koe, G. S. (2000). Physical stability of nonviral plasmid-based therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(3), 289-296. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200003)89:3<289::AID-JPS1>3.0.CO;2-N

- Andersen, M. Ø., Howard, K. A., Paludan, S. R., Besenbacher, F., & Kjems, J. (2008). Delivery of siRNA from lyophilized polymeric surfaces. *Biomaterials*, 29(4), 506-512. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.003
- ASTM E2524-08(2013), *Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles*. ASTM International, West Conshohocken, PA. doi:10.1520/E2524
- Baertschi, S. W. (c2005). *Pharmaceutical stress testing: Predicting drug degradation* (vol. 153): Boca Raton: Taylor & Francis.
- Bhatnagar, B. S., Bogner, R. H., & Pikal, M. J. (2007). Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12(5), 505-523. doi:10.1080/10837450701481157
- Bloomfield, V. A. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers*, 44(3), 269-282. doi:10.1002/(sici)1097-0282(1997)44:3<269::aid-bip6>3.0.co;2-t
- Brus, C., Kleemann, E., Aigner, A., Czubayko, F., & Kissel, T. (2004). Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: Physicochemical and biological characterization. *Journal of Controlled Release*, 95(1), 119-131. doi:10.1016/j.jconrel.2003.10.021
- Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1234-1270. doi:10.1016/j.addr.2013.07.005
- Carreño-Gómez, B., & Duncan, R. (1997). Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 148(2), 231-240. doi:10.1016/S0378-5173(96)04847-8
- Cavaluzzi, M. J., & Borer, P. N. (2004). Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, 32(1), e13. doi:10.1093/nar/gnh015
- Chang, K. L. B., Tai, M. C., & Cheng, F. H. (2001). Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4845-4851. doi:10.1021/jf001469g
- Chang, L., & Pikal, M. J. (2009). Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 2886-2908. doi:10.1002/jps.21825
- Chen, R. H., Chen, W. Y., Wang, S. T., Hsu, C. H., & Tsai, M. L. (2009). Changes in the Mark-Houwink hydrodynamic volume of chitosan molecules in solutions of different organic acids, at different temperatures and ionic strengths. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 902-907. doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.027
- Clamme, J. P., Azoulay, J., & Mely, Y. (2003). Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 84(3), 1960-1968. doi:10.1016/s0006-3495(03)75004-8
- Corbet, C., Ragelle, H., Pourcelle, V., Vanvarenberg, K., Marchand-Brynaert, J., Préat, V., & Feron, O. (2016). Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand

- structure, linker and grafting method. *Journal of Controlled Release*, 223, 53-63. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.020
- Corveleyn, S., De Smedt, S., & Remon, J. P. (1997). Moisture absorption and desorption of different rubber lyophilisation closures. *International Journal of Pharmaceutics*, 159(1), 57-65. doi:10.1016/S0378-5173(97)00263-9
- Cun, D., Foged, C., Yang, M., Frøkjær, S., & Nielsen, H. M. (2010). Preparation and characterization of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 390(1), 70-75. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.023
- Dandekar, P., Jain, R., Keil, M., Loretz, B., Koch, M., Wenz, G., & Lehr, C. M. (2015). Enhanced uptake and siRNA-mediated knockdown of a biologically relevant gene using cyclodextrin polyrotaxane. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(13), 2590-2598. doi:10.1039/C4TB01821D
- Danhier, F., Messaoudi, K., Lemaire, L., Benoit, J.-P., & Lagarce, F. (2015). Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: In vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 481(1-2), 154-161. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.01.051
- Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: Formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958. doi:10.1021/la7008545
- Duceppe, N., & Tabrizian, M. (2009). Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. *Biomaterials*, 30(13), 2625-2631. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.017
- Evani, S. J., & Ramasubramanian, A. K. (2001). Chapter 31: Hemocompatibility of Nanoparticles. Dans *Nanobiomaterials Handbook*: CRC Press.
- FDA, U. S. (2010). Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. Tiré de <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm>
- Feistel, R., & Wagner, W. (2007). Sublimation pressure and sublimation enthalpy of H₂O ice Ih between 0 and 273.16 K. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(1), 36-45. doi:10.1016/j.gca.2006.08.034
- Filion, D., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2007). Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. *Biomacromolecules*, 8(10), 3224-3234. doi:10.1021/bm700520m
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J., & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7), 1121-1131. doi:10.1016/s0142-9612(02)00445-3
- Goff, H. D., Verespej, E., & Jermann, D. (2003). Glass transitions in frozen sucrose solutions are influenced by solute inclusions within ice crystals. *Thermochimica Acta*, 399(1-2), 43-55. doi:10.1016/S0040-6031(02)00399-4

- Gómez, G., Pikal, M. J., & Rodríguez-Hornedo, N. (2001). Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions. *Pharmaceutical Research*, 18(1), 90-97. doi:10.1023/a:1011082911917
- Hawe, A., & Frieß, W. (2006). Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol-sucrose-NaCl formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(3), 316-325. doi:10.1016/j.ejpb.2006.06.002
- He, C., Yin, L., Song, Y., Tang, C., & Yin, C. (2015). Optimization of multifunctional chitosan-siRNA nanoparticles for oral delivery applications, targeting TNF- α silencing in rats. *Acta Biomaterialia*, 17, 98-106. doi:10.1016/j.actbio.2015.01.041
- Hinrichs, W. L. J., Manceñido, F. A., Sanders, N. N., Braeckmans, K., De Smedt, S. C., Demeester, J., & Frijlink, H. W. (2006). The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 311(1-2), 237-244. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.12.032
- Holme, H. K., Foros, H., Pettersen, H., Dornish, M., & Smidsrød, O. (2001). Thermal depolymerization of chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, 46(3), 287-294. doi:10.1016/S0144-8617(00)00332-5
- Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., & Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: Profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 297-304. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.023
- Hottot, A., Vessot, S., & Andrieu, J. (2007). Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chemical Engineering and Processing*, 46(7), 666-674. doi:10.1016/j.cep.2006.09.003
- Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. O., . . . Kjems, J. (2006). RNA Interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular Therapy*, 14(4), 476-484. doi:10.1016/j.ymthe.2006.04.010
- Huang, M., Fong, C.-W., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 391-406. doi:10.1016/j.jconrel.2005.05.004
- Ishii, T., Okahata, Y., & Sato, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1514(1), 51-64. doi:10.1016/S0005-2736(01)00362-5
- Izutsu, K.-i., Yonemochi, E., Yomota, C., Goda, Y., & Okuda, H. (2014). Studying the morphology of lyophilized protein solids using X-ray micro-CT: Effect of post-freeze annealing and controlled nucleation. *AAPS PharmSciTech*, 15(5), 1181-1188. doi:10.1208/s12249-014-0152-5

- Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., & Terada, K. (2009). Freeze-drying of proteins in glass solids formed by basic amino acids and dicarboxylic acids. *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 57(1), 43-48.
- Jancso, G., Pupezin, J., & Van Hook, W. A. (1970). Vapor pressure of ice between +10-2 and -1020. *The Journal of Physical Chemistry*, 74(15), 2984-2989. doi:10.1021/j100709a025
- Jean, M., Alameh, M., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2011). Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene Therapy*, 18(8), 807-816. doi:10.1038/gt.2011.25
- Jean, M., Alameh, M., De Jesus, D., Thibault, M., Lavertu, M., Darras, V., . . . Merzouki, A. (2012). Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1–2), 138-149. doi:10.1016/j.ejps.2011.10.029
- Jean, M., Smaoui, F., Lavertu, M., Methot, S., Bouhdoud, L., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2009). Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Therapy*, 16(9), 1097-1110. doi:10.1038/gt.2009.60
- Kabanov, A. V. (1999). Taking polycation gene delivery systems from in vitro to in vivo. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(9), 365-372. doi:10.1016/S1461-5347(99)00186-8
- Kabir, A., & Suresh Kumar, G. (2013). Binding of the biogenic polyamines to deoxyribonucleic acids of varying base composition: Base specificity and the associated energetics of the interaction. *PLoS ONE*, 8(7), e70510. doi:10.1371/journal.pone.0070510
- Kamerzell, T. J., Esfandiary, R., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., & Volkin, D. B. (2011). Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(13), 1118-1159. doi:10.1016/j.addr.2011.07.006
- Kasper, J. C., Schaffert, D., Ogris, M., Wagner, E., & Friess, W. (2011). Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability—A step closer from promising technology to application. *Journal of Controlled Release*, 151(3), 246-255. doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.003
- Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M., & Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1927), 4439-4451. doi:10.1098/rsta.2010.0175
- Katas, H., Cevher, E., & Alpar, H. O. (2009). Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 369(1-2), 144-154. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.10.012
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3-11. doi:10.1016/j.addr.2009.09.004

- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 25(22), 5293-5301. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.036
- Klauber, T. C. B., Søndergaard, R. V., Sawant, R. R., Torchilin, V. P., & Andresen, T. L. (2016). Elucidating the role of free polycations in gene knockdown by siRNA polyplexes. *Acta Biomaterialia*, 35, 248-259. doi:10.1016/j.actbio.2016.02.021
- Kornyshev, Alexei A., & Leikin, S. (2013). Helical structure determines different susceptibilities of dsDNA, dsRNA, and tsDNA to counterion-induced condensation. *Biophysical Journal*, 104(9), 2031-2041. doi:10.1016/j.bpj.2013.03.033
- Kwok, K. Y., Adami, R. C., Hester, K. C., Park, Y., Thomas, S., & Rice, K. G. (2000). Strategies for maintaining the particle size of peptide DNA condensates following freeze-drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1-2), 81-88. doi:10.1016/S0378-5173(00)00435-X
- Laursen, T., Hansen, B., & Fisker, S. (2006). Pain perception after subcutaneous injections of media containing different buffers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(2), 218-221. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_271.x
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.029
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., . . . Gupta, A. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149-1158. doi:10.1016/S0731-7085(03)00155-9
- Leong, K. W., Mao, H. Q., Truong-Le, V. L., Roy, K., Walsh, S. M., & August, J. T. (1998). DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*, 53(1-3), 183-193. doi:10.1016/j.jconrel.2013.09.032
- Lide, D. R. (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (85^e éd.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Liesebach, J., Rades, T., & Lim, M. (2003). A new method for the determination of the unfrozen matrix concentration and the maximal freeze-concentration. *Thermochimica Acta*, 401(2), 159-168. doi:10.1016/S0040-6031(02)00546-4
- Liu, J. S. (2006). Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: Techniques and applications in freeze-drying development. *Pharmaceutical Development and Technology*, 11(1), 3-28. doi:10.1080/10837450500463729
- Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. Ø., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., . . . Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6), 1280-1288. doi:10.1016/j.ymthe.2006.04.010

- Lu, H.-D., Zhao, H.-Q., Wang, K., & Lv, L.-L. (2011). Novel hyaluronic acid–chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis. *International Journal of Pharmaceutics*, 420(2), 358-365. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.046
- Ma, P. L. (2010). *Formation et caractérisation physicochimique des complexes ADN/chitosane pour la thérapie génique*. (Université de Montréal, École Polytechnique de Montréal).
- Ma, P. L., Buschmann, M. D., & Winnik, F. M. (2010a). Complete physicochemical characterization of DNA/chitosan complexes by multiple detection using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Analytical Chemistry*, 82(23), 9636-9643. doi:10.1021/ac100711j
- Ma, P. L., Buschmann, M. D., & Winnik, F. M. (2010b). One-step analysis of DNA/chitosan complexes by field-flow fractionation reveals particle size and free chitosan content. *Biomacromolecules*, 11(3), 549-554. doi:10.1021/bm901345q
- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry. *Biomacromolecules*, 10(6), 1490-1499. doi:10.1021/bm900097s
- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., & Rolland, A. P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release*, 56(1-3), 259-272. doi:10.1016/S0168-3659(98)00097-2
- Malmö, J., Sjørgård, H., Vårum, K. M., & Strand, S. P. (2012). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *Journal of Controlled Release*, 158(2), 261-268. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.012
- Mao, H.-Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., . . . Leong, K. W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 399-421. doi:10.1016/S0168-3659(00)00361-8
- Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 12-27. doi:10.1016/j.addr.2009.08.004
- McNally, E. J., & Hastedt, J. E. (2008). *Protein formulation and delivery* (2^e éd.). New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Meyer, J. D., Nayar, R., & Manning, M. C. (2009). Impact of bulking agents on the stability of a lyophilized monoclonal antibody. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(1), 29-38. doi:10.1016/j.ejps.2009.05.008
- Miyata, K., Kakizawa, Y., Nishiyama, N., Yamasaki, Y., Watanabe, T., Kohara, M., & Kataoka, K. (2005). Freeze-dried formulations for in vivo gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver. *Journal of Controlled Release*, 109(1-3), 15-23. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.043
- Moghim, S. M., Symonds, P., Murray, J. C., Hunter, A. C., Debska, G., & Szwedczyk, A. (2005). A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: Implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*, 11(6), 990-995. doi:10.1016/j.ymthe.2005.02.010

- Molina, M. d. C., Allison, S. D., & Anchordoquy, T. J. (2001). Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: Insight from other structural indicators. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(10), 1445-1455. doi:10.1002/jps.1096
- Molina, M. d. C., Armstrong, T. K., Zhang, Y., Patel, M. M., Lentz, Y. K., & Anchordoquy, T. J. (2004). The stability of lyophilized lipid/DNA complexes during prolonged storage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(9), 2259-2273. doi:10.1002/jps.20138
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), 397-411.
- Nguyen, S., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 528-533. doi:10.1016/j.carbpol.2008.08.013
- Niebel, Y., Buschmann, M. D., Lavertu, M., & De Crescenzo, G. (2014). Combined analysis of polycation/ODN polyplexes by analytical ultracentrifugation and dynamic light scattering reveals their size, refractive index increment, stoichiometry, porosity, and molecular weight. *Biomacromolecules*, 15(3), 940-947. doi:10.1021/bm4018148
- Nimesh, S., Thibault, M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: Effect of pH and serum. *Molecular Biotechnology*, 46(2), 182-196. doi:10.1007/s12033-010-9286-1
- Österberg, T., & Wadsten, T. (1999). Physical state of L-histidine after freeze-drying and long-term storage. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 301-308. doi:10.1016/S0928-0987(99)00028-7
- Padilla, A. M., Ivanisevic, I., Yang, Y., Engers, D., Bogner, R. H., & Pikal, M. J. (2011). The study of phase separation in amorphous freeze-dried systems. Part I: Raman mapping and computational analysis of XRPD data in model polymer systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 206-222. doi:10.1002/jps.22269
- Petrides, D., Siletti, C., Jiménez, J., Psathas, P., & Mannion, Y. (2011). Optimizing the design and operation of fill-finish facilities using process simulation and scheduling tools. *Pharmaceutical Engineering*, 31(2). Tiré de http://www.ispe.org/pharmaceutical_engineering/march2011
- Pfeifer, C., Hasenpusch, G., Uezguen, S., Aneja, M. K., Reinhardt, D., Kirch, J., . . . Rudolph, C. (2011). Dry powder aerosols of polyethylenimine (PEI)-based gene vectors mediate efficient gene delivery to the lung. *Journal of Controlled Release*, 154(1), 69-76. doi:10.1016/j.jconrel.2011.05.006
- Pikal-Cleland, K. A., Cleland, J. L., Anchordoquy, T. J., & Carpenter, J. F. (2002). Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(9), 1969-1979. doi:10.1002/jps.10184
- Pikal, M. J. (1985). Use of laboratory data in freeze drying process design: Heat and mass transfer coefficients and the computer simulation of freeze drying. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 39(3), 115-139.

- Pikal, M. J. (1990). Freeze-drying of proteins. Part I: process design. *BioPharm*, 3, 18-28.
- Pikal, M. J., Roy, M. L., & Shah, S. (1984). Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: Role of the vial. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(9), 1224-1237. doi:10.1002/jps.2600730910
- Pikal, M. J., Shah, S., Roy, M. L., & Putman, R. (1990). The secondary drying stage of freeze drying: Drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutics*, 60(3), 203-207. doi:10.1016/0378-5173(90)90074-E
- Pikal, M. J., Shah, S., Senior, D., & Lang, J. E. (1983). Physical chemistry of freeze-drying: Measurement of sublimation rates for frozen aqueous solutions by a microbalance technique. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(6), 635-650. doi:10.1002/jps.2600720614
- Platt, V. M., & Szoka, F. C. (2008). Anticancer therapeutics: Targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 474-486. doi:10.1021/mp800024g
- Rambhatla, S., Obert, J. P., Luthra, S., Bhugra, C., & Pikal, M. J. (2005). Cake shrinkage during freeze drying: A combined experimental and theoretical study. *Pharmaceutical Development and Technology*, 10(1), 33-40. doi:10.1081/PDT-35871
- Rao, S. B., & Sharma, C. P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(1), 21-28. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<21::AID-JBM4>3.0.CO;2-P
- Rey, L. R., & May, J. C. (c2004). *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products* (2^e éd. vol. 137). New York.
- Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization behavior of chitosan and chitosan–DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI. *Biomacromolecules*, 14(6), 1732-1740. doi:10.1021/bm4000713
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. doi:10.1016/S0928-0987(99)00028-7
- Romøren, K., Aaberge, A., Smistad, G., Thu, B. J., & Evensen, Ø. (2004). Long-term stability of chitosan-based polyplexes. *Pharmaceutical Research*, 21(12), 2340-2346. doi:10.1007/s11095-004-7687-1
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E., & Association, A. P. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*: Pharmaceutical Press.
- Roy, M. L., & Pikal, M. J. (1989). Process control in freeze drying: Determination of the end point of sublimation drying by an electronic moisture sensor. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 43(2), 60-66.
- Santagapita, P. R., & Buera, M. P. (2008). Electrolyte effects on amorphous and supercooled sugar systems. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354(15-16), 1760-1767. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2007.08.050

- Sato, T., Ishii, T., & Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22(15), 2075-2080. doi:10.1016/S0142-9612(00)00385-9
- Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S., & Winter, G. (2009). Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins I: Stability after freeze-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(5), 2256-2278. doi:10.1002/jps.22000
- Schneid, S., & Gieseler, H. (2008). *Effect of concentration, vial size, and fill depth, on product resistance of sucrose solution during freeze-drying*. Communication présentée à Proceedings of the 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelone, Spain.
- Schwarz, C., & Mehnert, W. (1997). Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 157(2), 171-179. doi:10.1016/S0378-5173(97)00222-6
- Searles, J. A., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (2001). Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine Tg' in pharmaceutical lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(7), 872-887. doi:10.1002/jps.1040
- Searles, J. A., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (2001). The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(7), 860-871. doi:10.1002/jps.1039
- Shah, B. N., & Schall, C. A. (2006). Measurement and modeling of the glass transition temperatures of multi-component solutions. *Thermochimica Acta*, 443(1), 78-86. doi:10.1016/j.tca.2006.01.003
- Shalae, E. Y., Johnson-Elton, T. D., Chang, L. Q., & Pikal, M. J. (2002). Thermophysical properties of pharmaceutically compatible buffers at sub-zero temperatures: Implications for freeze-drying. *Pharmaceutical Research*, 19(2), 195-201. doi:10.1023/A:1014229001433
- Sharma, V. K., Thomas, M., & Klibanov, A. M. (2005). Mechanistic studies on aggregation of polyethylenimine-DNA complexes and its prevention. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(5), 614-620. doi:10.1002/bit.20444
- Shcharbin, D., Pedziwiatr, E., Blasiak, J., & Bryszewska, M. (2010). How to study dendriplexes II: Transfection and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release*, 141(2), 110-127. doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.030
- Shelma, R., & Sharma, C. P. (2011). Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 561-570. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.02.018
- Shire, S. J. (2009). Formulation and manufacturability of biologics. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 708-714. doi:10.1016/j.ejpb.2006.06.002

- Slack, G. A. (1980). Thermal conductivity of ice. *Physical Review B*, 22(6), 3065-3071. doi:10.1103/PhysRevB.22.3065
- Strand, S. P., Lelu, S., Reitan, N. K., de Lange Davies, C., Artursson, P., & Vårum, K. M. (2010). Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*, 31(5), 975-987. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.102
- Sundaramurthi, P., Shalaev, E., & Suryanarayanan, R. (2010). Calorimetric and diffractometric evidence for the sequential crystallization of buffer components and the consequential pH swing in frozen solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(14), 4915-4923. doi:10.1021/jp100531v
- Tang, X. L., & Pikal, M. J. (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 191-200. doi:10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75
- Tanioka, S., Matsui, Y., Irie, T., Tanigawa, T., Tanaka, Y., Shibata, H., . . . Kono, Y. (1996). Oxidative depolymerization of chitosan by hydroxyl radical. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(12), 2001-2004. doi:10.1271/bbb.60.2001
- Tataurov, A. V., You, Y., & Owczarzy, R. (2008). Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophysical Chemistry*, 133(1-3), 66-70. doi:10.1016/j.bpc.2007.12.004
- Taylor, L. S., & Zografi, G. (1998). Sugar-polymer hydrogen bond interactions in lyophilized amorphous mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(12), 1615-1621. doi:10.1021/js9800174
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.010
- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Molecular Therapy*, 18(10), 1787-1795. doi:10.1038/mt.2010.143
- Tolokh, I. S., Pabit, S. A., Katz, A. M., Chen, Y., Drozdetski, A., Baker, N., . . . Onufriev, A. V. (2014). Why double-stranded RNA resists condensation. *Nucleic Acids Research*, 42(16), 10823-10831. doi:10.1093/nar/gku756
- Ullrich, S., Seyferth, S., & Lee, G. (2015a). Measurement of shrinkage and cracking in lyophilized amorphous cakes. Part 3: Hydrophobic vials and the question of adhesion. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(6), 2040-2046. doi:10.1002/jps.24441
- Ullrich, S., Seyferth, S., & Lee, G. (2015b). Measurement of shrinkage and cracking in lyophilized amorphous cakes. Part I: Final-product assessment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(1), 155-164. doi:10.1002/jps.24284
- Van Woensel, M., Wauthoz, N., Rosière, R., Mathieu, V., Kiss, R., Lefranc, F., . . . De Vleeschouwer, S. (2016). Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting

- Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration. *Journal of Controlled Release*, 227, 71-81. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.032
- Vårå, K. M., Ottøy, M. H., & Smidsrød, O. (2001). Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 89-98. doi:10.1016/S0144-8617(00)00288-5
- Veilleux, D., Chevrier, A., Panicker, R. K. G., Biniecki, K., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (submitted 13-07-2016). Lyophilisation and concentration of chitosan/siRNA polyplexes: Effects of oligonucleotide sequence, buffer composition, and coating with hyaluronic acid. *Biomacromolecules*.
- Veilleux, D., Nelea, M., Biniecki, K., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2016). Preparation of concentrated chitosan/DNA nanoparticle formulations by lyophilization for gene delivery at clinically relevant dosages. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(1), 88-96. doi:10.1016/j.xphs.2015.11.001
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1-2), 1-60. doi:10.1016/S0378-5173(00)00423-3
- Winkler, J. (2013). Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. *Therapeutic delivery*, 4(7), 791-809. doi:10.4155/tde.13.47
- Wu, Y.-Y., Zhang, Z.-L., Zhang, J.-S., Zhu, X.-L., & Tan, Z.-J. (2015). Multivalent ion-mediated nucleic acid helix-helix interactions: RNA versus DNA. *Nucleic Acids Research*, 43(12), 6156-6165. doi:10.1093/nar/gkv570
- Xie, Y., Qiao, H., Su, Z., Chen, M., Ping, Q., & Sun, M. (2014). PEGylated carboxymethyl chitosan/calcium phosphate hybrid anionic nanoparticles mediated hTERT siRNA delivery for anticancer therapy. *Biomaterials*, 35(27), 7978-7991. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.068
- Xu, L., & Anchordoquy, T. (2011). Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: Challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 38-52. doi:10.1002/jps.22243
- Yhee, J. Y., Song, S., Lee, S. J., Park, S.-G., Kim, K.-S., Kim, M. G., . . . Kim, K. (2015). Cancer-targeted MDR-1 siRNA delivery using self-cross-linked glycol chitosan nanoparticles to overcome drug resistance. *Journal of Controlled Release*, 198, 1-9. doi:10.1016/j.jconrel.2014.11.019
- Zillies, J. C., Zwioerek, K., Hoffmann, F., Vollmar, A., Anchordoquy, T. J., Winter, G., & Coester, C. (2008). Formulation development of freeze-dried oligonucleotide-loaded gelatin nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2), 514-521. doi:10.1016/j.ejpb.2008.04.026
- Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., . . . MacLachlan, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(7089), 111-114. doi:10.1038/nature04688